

STREPTOMYCES SÄDEBAKTEERIEN
KILPAILUSUHTEET JA VAIKUTUS PERUNARUVEN
TAUDINAIHEUTTAJIIN

Taru Ojanperä
Pro gradu –tutkielma
Helsingin yliopisto
Soveltavan biologian laitos
Kasvipatologia
Maaliskuu 2008

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metästieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Soveltavan biologian laitos	
Tekijä — Författare — Author Taru Ojanperä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title <i>Streptomyces</i> sädebakteerien kilpailusuhteet ja vaikutus perunaruven taudinaiheuttajiin			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kasvipatologia			
Työn laji — Arbetets art — Level Pro gradu –tutkielma	Aika — Datum — Month and year Helmikuu 2008	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 79 s.	
Tiivistelmä — Referat — Abstract <p>Perunaruven aiheuttajat <i>S. scabies</i>, <i>S. turgidiscabies</i> ja <i>S. aureofaciens</i> aiheuttavat lähinnä laadullisia tappioita muodostaen perunan mukuloihin rupea. Pahimmillaan taudinaiheuttajat hidastavat perunan taimettumista, lisäävät pienten mukuloiden määrää sekä vähentävät satoa. Viljelytekniset keinot eivät ole aina tehokkaita eivätkä kemialliset keinot ole Suomessa sallittuja.</p> <p>Työssä selvitettiin <i>Streptomyces</i>-kantojen ominaisuuksia biologisen torjunnan lähtökohdista. Tavoitteena oli selvittää Suomesta eristettyjen <i>Streptomyces</i>-sädebakteerien kykyä estää perunarupibakteerien kasvu eri pH-olosuhteissa. Tutkimuksiin valittiin sekä rupea aiheuttavia että rupea aiheuttamattomia kantoja. Lisäksi tutkittiin <i>Streptomyces</i>-sädebakteerien kykyä estää harmaahilseen ja perunaseitin taudinaiheuttajien (<i>Rhizoctonia solani</i> ja <i>Helminthosporium solani</i>) kasvua. Maljakokeissa tutkittiin sien- ja sädebakteerikantojen keskinäisiä kilpailusuhteita. Kasvihuonekokeissa tutkittiin sädebakteerien asettumista perunan juuristoon.</p> <p>Tutkituilta kannoilta löytyi hyviä biologisen torjuntaeliön ominaisuuksia. <i>Streptomyces</i>-kannat estivät toistensa kasvua. Kantojen estovaikutukset eivät liittyneet ruvenaiheuttamiskykyyn. Kaikki testatut kannat estivät harmaahilseen ja perunaseitin taudinaiheuttajien kasvua, mutta kannat <i>S. griseoviridis</i> ja kanta 16IV osoittautuivat erityisen tehokkaiksi estäjiksi. Kaikki kannat kasvoivat pH-oloissa välillä 5.5–8.0. Tunnistamaton <i>Streptomyces</i>-kanta 16IV kasvoi heikosti pH:ssa 5.5 ja yllättäen happamiin olosuhteisiin sopeutunut pohjanrupibakteerikanta (<i>S. turgidiscabies</i>) kasvoi erinomaisesti myös pH:ssa 8.0. Kaikki testatut sädebakteerikannat asuttivat perunan juuren.</p> <p>Tutkimuksissa löytyi potentiaalisia kantoja lisätutkimuksiin biologisen torjunnan agentiksi. Lisäkokeita tarvitaan mm. perunan juurenasutuksesta ja kantojen estovaikutuksista juuristo-olosuhteissa.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Perunarupi, <i>Streptomyces</i> , biologinen torjunta, harmaahilse, perunaseitti			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Soveltavan biologian laitoksen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työn ohjaajat: Hanna Kortemaa Evira, Jari Valkonen Helsingin yliopisto			

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Applied Biology	
Tekijä — Författare — Author Taru Ojanperä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title <i>Streptomyces</i> actinomycetes competitive balance and influence on potato scab pathogens			
Oppiaine — Läroämne — Subject Plant Pathology			
Työn laji — Arbetets art — Level Pro gradu thesis	Aika — Datum — Month and year February 2008	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 79 p.	
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>The causal agents of Potato scab, <i>S. scabies</i>, <i>S. turbidiscabies</i> and <i>S. aureofaciens</i> spoil the quality of tubers, slow down the formation of potato seedlings, increase the number of small sized tubers and therefore can have a significant impact on the potato harvest. Sometimes the technical methods applied in the potato farming are not effective enough and there are no chemical means available to prevent potato scab.</p> <p>In this work the properties of selected Finnish Actinomyces-isolates were studied from the point of view of biological control. Both potato scab forming and stains that do not cause visible signs of potato scab in tubers were selected for the study. The purpose was to study the ability of the stains to inhibit the growth of potato scab bacteria in different pH-conditions. In addition the ability of <i>Streptomyces</i>-strains to inhibit the growth of silver scurf, stem cancer and black scurf was studied. The competitive balance between different Actinomyces and fungal strains was tested on plates. Greenhouse tests were used to study the root infesting of Actinomyces strains.</p> <p><i>Streptomyces</i> strains inhibited each others growth. This inhibition was not linked to scab. All strains tested prevented the growth of silver scurf and ps pathogens but strains <i>S.griseoviridis</i> ja 16IV turned out being especially effective in preventing. All strains grew in pH-conditions 5.5-8.0. An unknown <i>Streptomyces</i> strain 16IV did not grow well in pH 5.5 and <i>S. turbidiscabies</i> which is known to persist in acidic conditions grew well also in pH 8.0. All tested strains colonized potato root.</p> <p>The study showed that some of the isolates had potential for future studies in biological control. More research is needed to study the root colonization and the antagonism properties of selected strains in root conditions.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords Potato scab, <i>Streptomyces</i> , Biological control, Silver scurf, Stem cancer and Black scurf			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Library of Department of Applied Biology			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information The counselors of the pro gradu thesis: Hanna Kortemaa Evira, Jari Valkonen University of Helsinki			

SISÄLLYS

ESIPUHE

1 JOHDANTO.....	7
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	8
2.1 <i>Streptomyces</i> sädebakteerit.....	8
2.1.1 Morfologia, ekologia ja metabolia.....	8
2.1.2 pH:n vaikutus sädebakteereihin.....	9
2.1.3 Perunarupibakteerit.....	10
2.1.3.1 <i>Streptomyces scabies</i>	10
2.1.3.2 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	11
2.1.3.3 <i>Streptomyces aureofaciens</i>	12
2.1.4 Taudinaiheuttamisen mekanismi ja taudinaiheuttajan ekologia.....	14
2.2 Perunaruvi.....	16
2.2.1 Perunaruven taloudellinen merkitys.....	16
2.2.2 Perunaruven torjunta.....	18
2.3 Antagonistiset <i>Streptomyces</i> sädebakteerit.....	20
2.3.1 Antagonismi ja sen mekanismit.....	20
2.3.2 Sädebakteerit antagonisteina.....	21
2.3.3 <i>Streptomyces griseoviridis</i> -sädebakteeri.....	22
2.3.4 Muita <i>Streptomyces</i> suvun antagonisteja.....	23
2.4 Sädebakteerit juurivyöhykkeessä.....	24
3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET.....	26
4 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	27
4.1 Bakteerikannat.....	27
4.2 Kasvatusalustat.....	28
4.3 Laitteet ja apuvälineet.....	30
4.4 Sädebakteerien kyky estää sienien kasvua.....	30
4.5 pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun.....	31
4.6 Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovaikutukset.....	32
4.6.1 Estovaikutus eri pH-oloissa.....	32
4.6.2 Kasvualustaan imeytyvät estoaineet.....	33
4.6.3 Seoskasvatus.....	33

4.7 Juurenasutuskyky.....	34
4.8 Tilastolliset menetelmät.....	35
5 TULOKSET.....	36
5.1 Sädebakteerien kyky estää sienten kasvua.....	36
5.2 pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun.....	37
5.3 Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovaikutukset.....	39
5.3.1 Estovaikutus eri pH-oloissa.....	39
5.3.2 Kasvualustaan imeytyvät estoaineet.....	44
5.3.3 Seoskasvatus.....	48
5.4 Juurenasutuskyky.....	54
6 TULOSTEN TARKASTELU.....	55
6.1 Sädebakteerien kyky estää sienten kasvua.....	55
6.2 pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun.....	56
6.3 Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovaikutukset.....	57
6.3.1 Estovaikutus eri pH-oloissa.....	57
6.3.2 Kasvualustaan imeytyvät estoaineet.....	61
6.3.3 Seoskasvatus.....	63
6.4 Juurenasutuskyky.....	63
7 YHTEENVETO.....	65
KIRJALLISUUS.....	66

ESIPUHE

Tutkimus oli osa suurempaa tutkimushanketta, joka aloitettiin vuonna 1997. Hankkeen vetäjänä toimii professori Jari Valkonen. Pro gradu –tutkielman kokeet suoritettiin nykyisen Eviran (entisen Kasvintuotannon tarkastuskeskuksen) siementarkastusosastolla Loimaalla kesän 1999 aikana. Laboratoriokokeet tehtiin osaston terveyslaboratoriossa.

Hanketta rahoittivat Kalkitusyhdistys, Kemira Agro Oy, Vapo Oy, Raision Yhtymän Tutkimussäätiö, Kemira Oy:n säätiö ja Agronomiliiton tieteellinen säätiö. Lisäksi tutkimukset liittyvät Järviseudun laatuperuna-hankkeeseen, joka oli osa EU:n 5b-ohjelmaa päärahoittajien ollessa Euroopan maatalouden ohjaus- ja tukirahasto sekä Etelä-Pohjanmaan TE-keskuksen maaseutuosasto. Rahoitukseen osallistuivat myös Evijärven, Kortesjärven, Lappajärven ja Vimpelin kunnat, Alajärven kaupunki sekä alueen perunanviljelijät.

Haluan kiittää työni ohjaajia MML Hanna Kortemaata ja professori Jari Valkoista saamastani ohjauksesta ja arvokkaista kommentteista. Esitän lämpimät kiitokseni myös Eviran henkilökunnalle, siitä että he mahdollistivat tutkimukseni suorittamisen Loimaalla. Erityisesti haluan kiittää terveyslaboratorion henkilökuntaa, sillä ilman heidän avuliaisuuttaan työni tulospöytäkirjan kerääminen ei olisi ollut mahdollista. Lisäksi kiitän Helsingin yliopiston soveltavan biologian laitoksen henkilökuntaa kaikesta avusta ja tarpeellisista neuvoista.

Loimaalla maaliskuussa 2008

Taru Ojanperä

1 JOHDANTO

Perunarupea aiheuttavia sädebakteerilajeja on useita. Yleisin ja tunnetuin taudinaiheuttaja on *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman & Henrici. Perunarupi on Euroopassa ja Pohjois-Amerikassa *Streptomyces*-bakteerien aiheuttamista kasvitaudeista taloudellisesti merkittävin. Pohjois-Amerikassa vuonna 1991 tehdyssä viljelijähaastattelussa perunarupi laskettiin perunan taudeista neljänneksi tuhoisimmaksi (LORIA ym. 1997, SLACK 1991). Suomen Perunantutkimuslaitoksen johtajan Paa-vo Kuisman (1997) mielestä rupisuus on jatkuvasti eräs pahiten perunan käyttöarvoa heikentävä laatuvirhe. Uusimpien tutkimustulosten mukaan perunarupi vähentää myös satoa vaikuttamalla perunan kasvuun (HILTUNEN ym. 2005).

Supressiiviseksi maiksi kutsutaan maita, joissa tiettyjen kasvitautien kasvu estyy maaperässä olevien patogeenille antagonististen mikrobien takia (WELLER ym. 2002). Jo vuonna 1959 Yhdysvalloissa Washingtonin osavaltiossa havaittiin perunaruven luonnollista heikentymistä pellossa, jossa oli viljelty perunaa useita vuosia (MENZIES 1959). Samanlaisia ilmiöitä havaittiin muuallakin Yhdysvalloissa (LORANG ym. 1989). Näillä supressiivisillä alueilla kasvaneista perunoista eristetyt *Streptomyces*-kannat osoittautuivat antagonistisiksi *S. scabies* -patogeenia vastaan, mutta ne eivät aiheuttaneet rupea (LIU 1992, LORANG ym. 1995). Monet *Streptomyces*-kannat tuottavat *S. scabies* -bakteerin kasvua estävää antibioottia (LIU 1992). On oletettavaa, että perunaruven luonnollinen heikkeneminen johtuu antagonistisista *Streptomyces*-kannoista (LIU ym. 1995).

Biologisella torjunnalla uskotaan tulevaisuudessa olevan suurta merkitystä perunaruven torjunnassa. Viljelytekniset keinot eivät ole aina tehokkaita (ALIVIZATOS & PANTAZIS 1992), eivätkä kemialliset menetelmät ole Suomessa sallittuja. Ulkomaisten havaintojen perusteella suomalaisista sädebakteerikannoista voi löytyä merkittäviä perunaruven biologiseen torjuntaan soveltuvia kantoja. Sädebakteerikannat ovat monimuotoisia ja niiden olosuhdeoptimiit ovat hyvin erilaisia. Jotta perunaruven taudinaiheuttajille pystyttäisiin luomaan torjuntastrategia antagonistisilla sädebakteereilla, on antagonismin olosuhdeoptimiit ensin selvitettävä.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Streptomyces*-sädebakteerit

Streptomyces-sädebakteerit ovat Gram-positiivisia bakteereita, joiden solut muodostavat rihmamaisia ketjuja. *Streptomyces*-lajeja on määritetty yli 400, joista suurin osa on saprofyyttisiä maaperäeliöitä. Saprofyytit ovat mädänsyöjiä, jotka saavat ravintonsa kuolleista eliöistä (LORIA ym. 1997, VALKONEN ym. 1996a). Vain pieni osa *Streptomyces*-sädebakteereista on patogeenisia kasveille ja eläimille. Kasveille patogeeniset lajit aiheuttavat oireita kasvien maanalaisiin osiin ja ensimmäisenä oireena on yleensä nekroosi (LORIA ym. 1997).

Streptomyces-bakteerien aiheuttamista kasvitaudeista tunnetuin on perunarupi, jota esiintyy perunoilla ja muilla juureksilla. Taudinaiheuttaja on yleensä *Streptomyces scabies*. *Streptomyces acidiscabies* Lambert & Loria aiheuttaa samantlaisia oireita kuin *S. scabies*, mutta bakteerien perimät eroavat toisistaan. *Streptomyces ipomoeae* (Person & Martin) Waksman & Henrici aiheuttaa bataatilla [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] juurten mätänemistä, joka oli taloudellisesti hyvin merkittävä tauti Yhdysvalloissa ennen kuin bataatista kehitettiin resistenttejä lajikkeita (CLARK & MOYER 1988). Japanissa *Streptomyces* sp. -sädebakteerit aiheuttavat juurikasvaimia melonille (*Cucumis melo* L.) (KOBAYASHI ym. 1987). Myös muutamat muut *Streptomyces*-lajit aiheuttavat kasvitauteja, mutta ne eivät ole yhtä merkittäviä kuin edellä mainitut (LORIA YM. 1997).

2.1.1 Morfologia, ekologia ja metabolia

Streptomyces-bakteerit ovat prokaryootteja, joille on ominaista kasvutapa jossa muodostuu yhtenäisiä bakteerijonoja, rihmastoa. Prokaryootit ovat alkeistumallisia soluja, eli niillä ei ole kalvon erottamaa tumaa (VALKONEN ym 1996a). Leviämisen mahdollistamiseksi bakteerikasvustosta kasvaa ilmarihmasto, bakteerisoluketju, jonka kärjestä irtoaa väliseinän muodostumisen jälkeen suvuttomia itiöitä, kuromia (konidia). Itiöketjut ovat kullekin *Streptomyces* lajille tyypillisen muotoisia ja niiden muodon perusteella laji pystytään määrittelemään taksonomisesti. Se voi olla suora,

aaltoileva, haaroittunut tai ruuvimaisesti kiertynyt. Sädebakteerikuromat muistuttavat kooltaan ja morfologialtaan varsinaisia bakteerisoluja (SHIRLING & GOTTLIEB 1966).

Sädebakteeripesäkkeet ovat useimmiten nukkamaisia tai jauhomaisia ja väritykseltään harmaita, valkoisia tai vaaleanpunertavia. Sädebakteerit muodostavat liukoisia väriaineita myös ravintoalustaan (ALEXANDER 1977). Pesäkelukumäärän perusteella ei sädebakteerien määrää maassa pystytä täysin luotettavasti määrittämään, sillä pesäke voi muodostua joko yhdestä tai useammasta bakteerisolusta. (SHIRLING & GOTTLIEB 1966).

Streptomyces-lajit elävät maassa, jossa ne hajottavat hydrolyyttisillä entsyymeillään orgaanista materiaalia ravinnokseen (SHIRLING & GOTTLIEB 1966). Ne tuottavat tunnetusti myös biologisesti aktiivisia sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita, erityisesti antibiootteja. *Streptomyces*-lajit tuottavat yli 70 % tunnetuista antibiooteista. Nämä aineenvaihduntatuotteet parantavat bakteereiden elinmahdollisuuksia maaperässä, jossa kilpailu elintilasta on kovaa. Suuri osa lääketieteellisesti merkittävistä antibiooteista, esimerkiksi streptomysiini, on *Streptomyces*-sädebakteerien tuottamia (GOODFELLOW ym. 1988).

Streptomyces-sädebakteerien tuottamat aineenvaihduntatuotteet ovat antimikrobisia monia erilaisia organismeja kohtaan. Esimerkiksi maaperässä elävien *Streptomyces*-sädebakteerien tuottama phthoxazolin A on antimikrobinen bakteereita, hiivoja ja rihmastollisia sieniä kohtaan (TANAKA ym. 1993). Ainakin yhdellä aineenvaihduntatuotteella, bialaphossilla, jota *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) Waksman & Henrici var *geldanus* ja *Streptomyces viridochromogenes* (Krainsky) Waksman & Henrici tuottavat, tiedetään olevan herbisidisiä ominaisuuksia (MURAKAMI ym. 1986).

2.1.2 pH:n vaikutus sädebakteereihin

Sädebakteerit kasvavat yleensä hyvin kasvualustan pH:n ollessa välillä 6.5–8.0. Useimmat sädebakteerikannat eivät kasva pH:n laskiessa alle 5.5:n ja muutamat kannat eivät pysty kasvamaan pH:n noustessa yli 6.0:n (CRAWFORD ym. 1993).

S. scabies -bakteerin kasvu on optimaalisinta kasvualustan pH:n ollessa välillä 5.0–8.0. Se ei kasva pH:n laskiessa 4.8 alapuolella. On olemassa *Streptomyces*

–lajeja, jotka kasvavat jopa pH:ssa 4.0 (LORIA ym. 1997). Happamassa maassa (pH 5.3) *S. scabies* -bakteerien itiöt eivät jakaudu (SANFORD 1926).

Kalkitus CaCO_3 :lla alentaa maan pH:ta ja lisää perunaruven taudinaiheuttajien määrää maassa (LAMBERT & LORIA 1989a). KEINATHin ja LORIAN (1989a) mukaan taudinaiheuttajan määrän lisääntymisen aiheuttaa kalsium. LAMBERT ja MANZER raportoivat kuitenkin vuonna 1991, että kalsiumin määrällä perunan mukulassa tai maassa, tai maahan lisätyllä kalsiumilla, ei ole tilastollisesti merkittävää vaikutusta perunarupeen. Heidän kokeissaan pH:n muutos on vaikuttava tekijä perunaruven määrässä mukuloissa.

2.1.3 Perunarupibakteerit

Suomessa esiintyy tavallista rupibakteeria *Streptomyces scabies*, pohjanrupibakteeria *Streptomyces turgidiscabies* Miyajima ym. sekä verkkorupea aiheuttava *Streptomyces aureofaciens* Duggar (VALKONEN & PALOHUHTA 1999). LINDHOLM ym. (1997) havaitsi Suomesta löydettyjen perunarupibakteereiden omaavan laajemman vaihtelun kuin muualla maailmassa. Kannat ovat sopeutuneet Suomen kylmiin ja kosteisiin olosuhteisiin. *Streptomyces*-lajeja tunnistetaan seuraavien ominaisuuksien perusteella: melaniinin tuotto, kahdeksan eri hiilenlähteen hyödyntäminen sekä bakteerikasvuston, bakteerisolujonojen muodostamien ilmarihmojen ja bakteerisolujen ulkonäkö (LORIA & KEMPTER 1986).

2.1.3.1 *Streptomyces scabies*

Ensimmäisen kerran perunaruven taudinaiheuttaja määriteltiin THAXTERin toimesta vuonna 1880 ja taudinaiheuttaja sai nimen *Oospora scabies*. Nämä patogeeniset kannat tuottivat liukenevaa ruskeaa pigmenttiä, melaniinia, ja korkkiruuvimuotoisia soluketjuja joista irtosi harmaita itiösoluja. Tyypikantaa ei säilytetty ja vuonna 1914 GUSSOW nimesi lajin uudelleen. Tällä kerta nimeksi tuli *Actinomyces scabies*. Lopullisen nimensä *S. scabies* sai vuonna 1948 WAKSMAN ja HENRICI: n toimesta (LORIA ym. 1997).

Suurin osa Suomesta eristetyistä patogeenisistä sädebakteerikannoista muistuttaa *S. scabies* tyyppikantaa ATCC 49173. *S. scabies* –tyyppikannan kasvusto on väriltään harmaata tai ruskeaa. Sen itiösolut, jotka muodostuvat korkkiruuvien muotoisissa soluketjuissa, ovat sileitä ja harmaita. Kanta tuottaa melaniinia, on herkkä streptomysiinille ja pystyy hyödyntämään kansainvälisen *Streptomyces* projektin (International *Streptomyces* Project, ISP) suosittelemia diagnostisia sokereita. Bakteerin tynnyrinmuotoiset itiösolut ovat kooltaan $0.8\text{--}1.7 \times 0.5\text{--}0.8 \mu\text{m}$ (HOOKER 1981). Patogeeniset *S. scabies* –kannat tuottavat fytotoksiineja, takstomiineja. Patogeenien tuottamista fytotoksiineista takstomiini A on pääasiallinen tuote ja lisäksi tuotetaan pieniä määriä takstomiini B:tä (KING ym. 1991, LAWRENCE ym. 1990).

S. scabies -perunarupibakteeri aiheuttaa ympäri maailmaa tavallista perunarupea (HOOKER 1981). Tämä laji voi aiheuttaa mukuloihin koho-, syvä- ja pintarupea, mutta kohorupi on lajille ominaisinta (LORIA ym. 1997). Kaikki *S. scabies* -kannat eivät ole patogeenisia (HEALY & LAMBERT 1991). Bakteeria löytyy kaikilta alueilta joilla harjoitetaan ammattimaista perunanviljelyä. Laji on sopeutunut olosuhteisiin, joissa pellot ovat hyvässä kasvukunnossa, pellon ojitus ja kalkitus ovat kunnossa ja maan pH on lähellä neutraalia. LINDHOLM ym. (1997) mukaan *S. scabies* kasvaa pH:ssa 4.8, mutta pH:ssa 4.6 se ei enää kasva. Myös LAMBERTIN ja LORIAN (1989a) mukaan *S. scabies* ei kasva enää pH:ssa 4.5. Lajille optimaalinen kasvilämpötila on $+30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Maaperän suuri kosteus on lajille haitallista. Siksi sadetusta käytetäänkin taudin yhtenä torjuntakeinona (LORIA ym. 1997).

2.1.3.2 *Streptomyces turgidiscabies*

Pohjanrupibakteeri, *Streptomyces turgidiscabies*, on nimetty Itä-Hokkaidossa Japanissa aiheuttamiensa kohorupioireidensa mukaan (MIYAJIMA ym. 1998). Suomessa esiintyy koko perunantuotantoalueella morfologisesti ja fysiologisesti *S. turgidiscabies* -bakteeria muistuttavia perunarupikantoja (LINDHOLM ym. 1997), jotka vastaavat perimältään 99.9 %:sti japanilaista *S. turgidiscabies* –kantaa. Näin ollen kannat voidaan lukea kuuluvaksi samaan lajiin (KREUZE ym. 1999). Myös Pohjois-Ruotsista on löydetty pohjanrupibakteerikantoja (LEHTONEN ym. 2004).

Pohjanrupibakteeri kasvaa hieman happamammissa oloissa kuin tavallinen rupibakteeri (LINDHOLM ym. 1997). Bakteerin aiheuttamat oireet ovat ankaria.

Sen aiheuttamat rupilaikut erottuvat mukulan kuoresta erityisen korkeina kohoumina (MIYAJIMA ym. 1998). KREUZE ym. (1999) mukaan *S. turgidiscabies* -kantojen aiheuttamat rupioireet eroavat edellä mainituista oireista, mikä saattaa johtua käyte-tyistä perunalajikkeista, sillä *S. turgidiscabies* -kannat aiheuttivat Bintje-lajikkeen mukuloihin syvärupea. HILTUNEN ym. (2005) kokeissa lajikkeilla ”Bellona”, ”Matilda” ja ”Sabina” *S. turgidiscabies* ja *S. scabies* aiheuttivat kaikilla kolmella lajikkeella samankaltaista pinta-, koho- ja syvärupea. Oireiden voimakkuus vaihteli riip-puen käytetystä perunalajikkeesta ja bakteerirodusta.

Rupioireiden perusteella ei pohjanrupibakteeria pysty erottamaan tavalli-sesta perunaruvesta (HILTUNEN ym. 2005), varsinkin kun kannat esiintyvät usein samalla pelloilla (LINDHOLM ym. 1997) ja jopa samassa rupilaikussa (LEHTONEN ym. 2004). Kosteissa maaoloissa pohjanrupibakteerin on havaittu ai-heuttavan rupea runsaammin kuin tavallinen perunarupi (LEHTONEN ym. 2003).

Pohjanrupibakteerin itiöketjut ovat taipuisia ja kasvusto on väriltään harmaata. Lajin itiöt ovat lieriömäisiä, pehmeitä ja kooltaan 0.5-0.6x1.0-1.2. µm. *S. turgidiscabies* ei tuota melaniinia eikä muitakaan pigmenttejä. Hiilenlähteenään se käyttää raffinoosia ja inuliinia. Se kasvaa kasvatusalustalla, jonka pH-arvo on välillä 4.0-5.0 (MIYAJIMA ym. 1998).

Koska *S. turgidiscabies* aiheuttaa samanlaisia rupioireita kuin *S. scabies* -bakteeri, on oletettavaa, että niiden taudinaiheuttamismekanismit ovat samankaltaiset. Molemmat tuottavat takstomiineja, jotka ovat *Streptomyces*-sukuisten patogee-nien virulenssin tärkeä tekijä (LORIA ym. 1995). Koska kannat esiintyvät pohjoises-sa Skandinaviassa usein samoilla pelloilla, on torjunnassa otettava huomioon mo-lempien kantojen erityispiirteet. Se, että eri lajikkeet reagoivat samalla tavalla mo-lempiin bakteerilajeihin on hyvä, sillä silloin resistenttien lajikkeiden viljely on var-teenotettava torjuntamenetelmä (HILTUNEN ym. 2005).

2.1.3.3 *Streptomyces aureofaciens*

Verkkoruven taudinaiheuttajia ovat useat tuntemattomat *Streptomyces spp.* -suvun la-jit. Verkkorupea esiintyy sekä Pohjois-Amerikassa, että Euroopassa. Eri mantereilla tautia kutsutaan eri nimellä; Amerikassa nimi on ”russet scab” ja Euroopassa ”netted

scab”. Taudinaiheuttajat ovat todennäköisesti eri kantoja eri mantereilla, joissa bakteerit ovat sopeutuneet paikallisiin olosuhteisiin (BÅNG 1979a).

Osa verkkorupea aiheuttavista kannoista luetaan *S. aureofaciens* -lajiin. Lajin tuottamat soluketjut ovat keltaisia ja taipuisia. Se ei tuota melaniinia ja sen itiökotelot ovat taipuisia ja itiöt harmaita. Bakteeri pystyy hajottamaan ksantiinia. *S. aureofaciens* kasvaa kasvualustalla, jonka pH on yli 5.0. (FAUCHER ym. 1993). LABRUYÉREN (1971) mukaan verkkoruvella optimaalinen pH:n vaihteluväli on 6.5–7.0.

Suomesta eristetty kanta numero 317 (LINDHOLM ym. 1997) osoittautui testeissä *S. aureofaciens* -lajiksi (KREUZE ym. 1999). Kirjallisuuden perusteella tämä oli ensimmäinen kerta, kun *S. aureofaciens* eristettiin Euroopasta.

Eurooppalainen verkkorupi ilmenee mukuloissa pinnallisina ruskeina alueina, jotka muodostavat verkkomaisen kuvion. Myös perunan muihin maanalaisiin osiin, kuten juuriin, muodostuu nekroosia, joka yhdessä mukularuven kanssa voi aiheuttaa huomattavia satotappiota. Verkkorupista siemenperunaa käytettäessä itäminen on hitaampaa ja versoja muodostuu vähemmän kuin tervettä siementä käytettäessä. Myös sato jää näin ollen pienemmäksi (BÅNG 1979a). Alttiilla perunalajikkeella satotappiot johtuvat verkkoruvien aiheuttamista juurituhousta (SCHOLTE & LABRYÈRE 1985).

Pohjois-Amerikassa esiintyvä verkkorupi muodostaa mukuloihin pintarupea, joka rajoittuu mukulan korkkikuoreen. Amerikkalaisen verkkoruvien rupilaikut eivät ole säännöllisen verkkomaisia, kuten eurooppalaisessa verkkoruvessa, eikä se aiheuta laikkuja juuriin. Nykyisin Japanissakin esiintyvä amerikkalainen verkkorupi ei aiheuta satotappiota kuten eurooppalainen verkkorupi (HARRISON 1962, ONIKI ym. 1986).

Pohjois-Ruotsissa tutkitut verkkoruvien aiheuttajat viihtyvät kosteassa ja viileässä ilmastossa, jossa *S. scabies* taas ei viihdy (BÅNG 1995). Verkkorupi onkin yleisempi Pohjois-Ruotsissa kuin maan eteläosissa, koska pohjoisessa on kosteampaa ja viileämpää. Verkkoruvien aiheuttajat viihtyvät myös happamammissa oloissa kuin *S. scabies* (BÅNG 1979a, FAUCHER ym. 1993).

2.1.4 Taudinaiheuttamisen mekanismi ja taudinaiheuttajan ekologia

Mukulat ovat alttiita infektiolle varhaisessa mukulanmuodostusvaiheessa, jolloin ne kasvavat nopeasti ja niissä on paljon nuorta erilaistumatonta korkkihuokossolukkoa (HOOKER 1981).

Ensimmäiset mikroskooppiset havainnot tartunnasta ovat pienet ruskeat laikut korkkihuokossolukossa. Patogeenin tunkeutuminen saa mukulan muodostamaan haavasolukkoa muutamaa solukerrokseen tunkeutumiskohdan alapuolelle. Jos muodostunut haavasolukko estää patogeenin etenemisen, muodostuu pintarupi. Jos taas kasvitautin eteneminen jatkuu, muodostaa mukula vielä toisen ja joskus jopa kolmannen haavasolukkerroksen. Mitä syvemmälle patogeeni etenee ja enemmän haavasolukkoa muodostuu, sitä suurempia ovat rupilaikut. Ympäristötekijät, perunajalijkeen taudinkestävyys ja taudinaiheuttajan rotu vaikuttavat siihen, minkä muotoisia taudin aiheuttamat rupilaikut ovat (DOERING-SAAD ym. 1992, LAMBERT & LORIA 1989a, LAPWOOD 1973).

Patogeeniset *Streptomyces*-lajit tuottavat takstomiineja. Takstomiinit ovat fytotoksiineja, jotka ovat patogeenisuuden tärkein syy. *S. scabies* -sädebakteerin aiheuttamat mukulaoireet eivät eroa takstomiinilla aiheutetuista oireista (LAWRENCE ym. 1990, LORIA ym. 1995). Tärkein *S. scabies* ja *S. acidiscabies* -bakteereiden tuottamasta kymmenestä takstomiinista on takstomiini A (KING & LAWRENCE 1996). Takstomiinit estävät selluloosan biosynteesin, mikä saa aikaan kasvisolujen romahduksen, koska soluseinät jäävät heikoiksi (FRY & LORIA 2002, SCHEIBLE ym. 2003). Puhtaalla takstomiini-A:lla tehdyistä kokeista on saatu viitteitä, että se tappaa retiisin taimet suurena pitoisuutena, mutta pieni pitoisuus aiheuttaa juuren liikakasvua. Samanlaisia tuloksia on saatu osittain puhdistetulla takstomiini-A:lla (LEHTONEN ym. 2003, LEINER ym. 1996). Nämä tulokset viittaisivat siihen, että oloissa, joissa rupibakteerien takstomiini-A:n tuotto on runsasta, mukulan solukko kuolee ja rupioireet ovat lähinnä syvärupea. Jos rupibakteerin kasvuolot eivät ole optimaaliset tai jos rupikannan taudinaiheuttamiskyky ei ole erityisen voimakas, oireina saattaa esiintyä vain solukon liikakasvua. Tämä ilmenee kohorupena (LEHTONEN ym. 2003). Syväruven muodostumisen yhteydessä on havaittu hydrolyyttisten entsyymien erittymistä, mitä ei havaita pinta-, tai kohoruven yhteydessä (FAUCHER ym. 1995).

Perunarupipatogeenin ekologiasta ja epidemiologiasta on vähän tietoa, sillä patogeenin populaatioiden tiheyden määrittäminen maassa on vaikeaa. Sädebakteeripopulaatioiden on todettu kasvavan perunoiden vaikutuksesta. Populaatiotiheydet ovat suurempia perunamaassa, kuin maassa, jossa perunaa ei viljellä (HOOKER 1956). Ritsosfäärissä ja mukulan pinnalla on taas tiheämpi populaatio kuin ympäröivässä maassa. Perunarupisten mukuloiden lähettyvillä *S. scabies* -bakteerin populaation tiheys on 12-37 kertaa suurempi kuin ympäröivässä maaperässä (KEINATH & LORIA 1989b).

Perunarupipatogeeni voi säilyä maassa vuosia ilman isäntäkasvia (VRUGGINK 1976). Lisäksi patogeenilla on useita isäntäkasveja, sillä *S. scabies*- ja *S. acidiscabies* -bakteereiden on todettu aiheuttavan taimipoltetta rypsilä ja vehnällä. Taudilla on siis isäntäkasveja sekä yksi-, että kaksisirkkaisissa kasveissa (LORIA ym. 1996). Perunarupipatogeeni on monosyklinen eli taudilla on vain yksi kierto kasvukaudessa. Siksi alkuperäisen tartukkeen (ts. tartunnan lähteen) määrä on ratkaisevan tärkeää määriteltäessä taudin kehitystä. Jo vuonna 1937 GOSS havaitsi kasvihuoneessa sterilissä kasvualustassa tekemissään kokeissa tartukkeen ja perunaruvan aiheuttamien rupilaikkujen määrän välillä positiivista korrelaatiota. Peltokokeissa rupea aiheuttamattomat *S. scabies* -kannat vaikeuttavat alkuperäisen tartukkeen määrän määrittämistä. Alkuperäisellä tartukkeen määrällä ja perunaruvan vakavuudella on lineaarinen suhde. Siksi taudin tuhoisuuden ennustamiselle pellon perunarupipatogeenipopulaation määrittäminen on kaikista tärkein selvítettävä asia. Kaksi muuta tärkeää tekijää taudin kehityksen ennustamisessa ovat perunalajikkeeseen alttius ja perunarupikannan virulenssi (KEINATH & LORIA 1991).

Perunalajikkeella ei ole vaikutusta sädebakteerien määrään maassa ja ritsosfäärissä. Kuitenkin mukulan pinnalla sädebakteeripopulaatiot ovat tiheimpiä perunaruvella alttiissa lajikkeessa kuin kestävässä. Alttiin lajikkeeseen mukulan pinnalla on myös suuremmat määrät *S. scabies* -bakteeria ja muita melaniinia tuottavia bakteereita kuin resistentillä lajikkeella (ADAMS & LAPWOOD 1978, KEINATH & LORIA 1989b).

2.2 Perunarupi

Useat *Streptomyces* spp. -sädebakteerisuvun lajit aiheuttavat perunarupea, mutta tärkein taudinaiheuttaja on *S. scabies*. Sen aiheuttama infektio tapahtuu kehittyvän mukulan korkkihuokossolukossa. Taudin edistyessä korkkihuokossolukkoon muodostuu perunaruvelle ominaisia haavaumia, rupia (HOOKER 1981).

Mukulan oireiden perusteella perunarupi jaetaan kolmeen tyyppiin: koho-, pinta- ja syvärupeen (HOOKER 1981, LORIA ym. 1997). Pintarupeessa mukulan korkkikuori säilyy ehjänä tai vaurioituu vain lievästi ja siihen muodostuu vain yksi haavasolukkerros. Koho- ja syvärupeessa mukulan korkkikuori rikkoutuu ja siihen muodostuu jopa kolme haavasolukkerrosta (JELLIS 1977). Kohorupea, kohollaan olevia nystyröitä mukulan pintaan, aiheuttavat pääasiassa *S. scabies* ja *S. acidiscabies*. Pintaruvet ovat laajoja ja tasaisia rupia (LORIA ym. 1997). Syvärupi voi ulottua jopa seitsemän millimetrin syvyyteen mukulan maltoon (HOOKER 1981). Eri sädebakteerilajit voivat aiheuttaa samanlaisia oireita. Näin ollen tietyt rupioireet eivät ole tiukasti sidoksissa tiettyihin bakteerilajeihin (VALKONEN & PALOHUHTA 1999).

2.2.1 Perunaruven taloudellinen merkitys

Perunan mukuloiden laatu ja markkina-arvo kärsivät rupisuudesta huomattavasti. Perunarupi heikentää teollisuus-, kotitarve- ja siemenperunan kauppakuntoa ulkoisten vaurioiden ja taudin siemenleviävyyden tähden (KUISMA 1997). Elintarviketurvallisuusviraston siemenperunan laatuluokituksen puitteissa sertifioidussa siemenerässä saa olla enintään viisi painoprosenttia sellaisia mukuloita, joiden pinnasta yli kolmannes on ruven peitossa. Ensimmäisen luokan ruokaperunaksi kelvataksaan perunan pinnasta saa olla korkeintaan 25 % ruven peitossa. Teollisuuskäytössä ankara rupisuus on haitallista, koska rupilaikkuista ei saa kaikkea multaa ja hiekkaa pestyä pois (LEHTONEN ym. 2003). Myös syvärupi estää mukuloiden käytön teollisuudessa, sillä syvärupisia mukuloita ei voida käyttää esimerkiksi ranskanperunoiden tai perunalastujen raaka-aineena (ARCHULETA & EASTON 1981).

Uusimpien tutkimusten mukaan *S. scabies* ja *S. turgidiscabies* hidastavat perunan taimettumista, lisäävät pienten mukuloiden määrää sekä vähentävät satoa.

Joissain tapauksissa perunan sato pienenee jopa 27 %, koska patogeenit heikentävät kasvin kasvua (HILTUNEN ym. 2005). Myös verkkorupi aiheuttaa kauppakunnan heikentymisen lisäksi satotappioita (BÅNG 1979). Saastuneesta siemenperunasta peräisin oleva verkkorupitartunta aiheuttaa suurempia satotappiota kuin maaperästä peräisin oleva tartunta (BÅNG 1995).

Tavallinen perunarupi ei yleensä aiheuta merkittäviä tappioita maaperän pH:n ollessa alle 5.2 (HOOKER 1981). Perunarupi on kaikista tuhoisin maaperän pH:n ollessa välillä 5.2 ja 7.0. Kuitenkin happamiin oloihin sopeutunut *S. aciscabies* aiheuttaa rupioireita jopa pH:ssa 4.5 (LORIA ym. 1997, LAMBERT & LORIA 1989a,b). Perunalajikkeiden alttius ruvelle vaihtelee eikä yksikään lajike ole taudille immuuni. Vain muutama perunalajike on taudille hyvin resistentti. Resistentitkin lajikkeet, kuten ”Russet Burbank” ja ”Superior”, saavat taudin kehittymiselle otollisissa olosuhteissa vakavia oireita (GOTH ym. 1993).

Suurin osa Pohjois-Amerikassa markkinoilla olevista perunalajikkeista on perunaruvelle alttiita (POWELSON ym. 1993). Suomalaisista ruoka- ja ruokateollisuusperunalajikkeista ”Matilda”, ”Bintje” ja ”Sini” ovat perunaruvelle alttiita ja ”Siikli” ja ”Suvi” melko alttiita. Kestävimpiä Suomessa käytetyistä lajikkeista ovat ”Kulta”, ”Nicola”, ”Van Gogh”, ”Pito” ja ”Vento”. Tärkkelysperunalajikkeista ”Kardal” on perunaruvelle altis ja ”Saturna” kestävä (RAHKONEN 1997). Pohjoismaiden oloissa ”Sabina” on kestävämpi lajike kuin ”Matilda” ja ”Bellona”, joilla esiintyy enemmän erityisesti vakavia rupioireita (HILTUNEN ym. 2005).

Perunarupibakteerit aiheuttavat rupea myös muille mukulakasveille ja juureksille, kuten porkkanalle [*Daucus carota* ssp. *sativus* (Hoffm.) Schübler & Martens], punajuurelle (*Beta vulgaris* L.), lantulle (*Brassica napus* L. var. *napobrassica*), nauriille (*Brassica rapa* L. var. *rapa*), palsternakalle (*Pastinaca sativa* L.) ja retiisille (*Raphanus sativus* L.), mutta tauti ei ole niillä yhtä merkittävä kuin perunalla (JONES 1953). Useimmat patogeeniset perunarupibakteerit aiheuttavat rupioireita porkkanalle ja retiisille, kun taas punajuurella, perunalla, lantulla ja nauriilla perunarupibakteerien ruvenaiheuttamiskyky vaihtelee (GOYER & BEAULIEU 1997).

2.2.2 Perunaruven torjunta

Perunarupi on maalevintäinen tauti. Perunarupibakteerit viihtyvät lämpimissä ja ilmavissa oloissa ja siksi tautia esiintyy kuivina ja lämpiminä kesinä erityisesti sellaisissa maissa, joissa pH on esimerkiksi kalkituksen vuoksi lähellä neutraalia (LAMBERT & LORIA 1989a). Esikasvin olkien kyntämistä maahan tulisi välttää, jottei maan ilmavuus ja sitä kautta perunoiden rupisuus lisääntyisi (VALKONEN ym. 1996b, VALKONEN & PALOHUHTA 1999). Perunarupipatogeeni voi olla peräisin saastuneesta mukulasta tai maaperästä ja patogeeniä löytyy kaikilta perunanviljelyalueilla (LORIA ym. 1997). Perunaruven torjuntaan on kokeiltu useita erilaisia kasvinsuojelutoimenpiteitä, kuten kastelua mukulan muodostusvaiheessa, viherlannoitusta, viljelykiertoa, kemiallista torjuntaa sekä maaperän pH:n alentamista. Maaperän luontaista pH:ta voidaan alentaa levittämällä happoa tuottavia lannoitteita tai rikkiyhdisteitä. Valitettavasti useimmat viljelykasvit kärsivät maan pH:n alenemisesta siinä määrin, että tätä torjuntamenetelmää ei voida käyttää perunalla eikä suurimmalla osalla vihanneksia. Lisäksi, kuten edellä mainittu, on olemassa perunarupikantoja, jotka viihtyvät happamammissa oloissa (HOOKER 1981).

Mukuloiden taudille altis aika alkaa kun mukulan läpimitta on kaksinkertainen version läpimittaan verrattuna ja jatkuu siitä keskimäärin 6-8 viikkoa eteenpäin (LORIA ym. 1997). Ruven torjunnassa on onnistuttu pitämällä maan kosteus mukulan muodostumisen alkamisesta kuuden viikon ajan – 0.46 bar:in ja kenttäkapasiteetin välillä (DAVIS ym. 1976). Erityisen tärkeää ruventorjunnassa on mukulanmuodostuksen alkuvaiheessa pitää maa kosteana riittävä pitkän jakson ajan. Lyhyillä, kahden viikon kosteilla jaksolla ei ole ruventorjunnassa merkittävää hyötyä (LEWIS 1970).

Kylvöajankohdalla on merkitystä perunaruven torjunnassa sillä aikaisin keväällä viileään maahan kylvettäessä kasvin kehitys on hidasta. Verkkorupi iskeytyy perunan juuriin kasvukauden alussa hidastaen kasvin kehitystä. Tämä antaa rupipatogeenille hyvät mahdollisuuden infektoida juuristoa ja mukuloita (SCHOLTE 1989). Myöhemmin kasvukaudella, jolloin kasvilla on paremmat olosuhteet kehittyä ja juuret kasvavat nopeammin, ei kasvitauti vahingoita perunaa yhtä paljon (BÅNG 1995).

Viljelykierto on tehokas keino estää perunaruven lisääntyminen. Kuuden vuoden viljelykiertokokeessa ”Bintjellä” verrattiin vuosittain yksipuolisessa perunan

viljelyssä kasvaneiden perunoiden ja viljelykierrossa kasvaneiden perunoiden verkkoruen määrää. Yksipuolisessa perunanviljelyssä verkkoruen määrä kasvaa vuosi vuodelta, mutta viljelykierrossa verkkoruen määrä vaihtelee eri vuosina, mutta sen määrä ei merkittävästi muutu kuuden vuoden aikana. (LOMAKKA 1971, SCHOLTE 1992). Viljelykierrossa myös perunan esikasvi vaikuttaa perunaruven määrään. Esikasvikokeissa ”Matildalla” ja Sabinalla” perunarupea esiintyy eniten kun esikasvina on ollut peruna. Ruvelle altis ”Matilda” on pahiten rupista kuminan ja kauran jälkeen ja vähiten rupista kun esikasvina on rypsi tai ohra. ”Sabinalla”, joka sietää rupea hieman ”Matiltaa” paremmin, erot eivät ole yhtä selkeitä (LEHTONEN ym. 2003).

LIU:n ym. (1996) mukaan tällä hetkellä luotettavin ruventorjuntakeino on ruvenkestävän lajikkeen käyttö, vaikka täysin ruvenkestävää lajiketta ei olemassa olekaan (LORIA 1991). On todennäköistä, että rupiresistenssiä ohjaavat useat eri geenit. Perunalajiketta, joka olisi täysin resistentti ja jolle perunarupi ei aiheuttaisi mitään oireita, tuskin koskaan saadaan aikaiseksi (HOSAKA ym. 2000).

Joidenkin biologisten torjuntaeliöiden on todettu vähentävän perunaruven määrää. Esimerkiksi eräästä perunamaasta nostetuista mukuloista on eristetty *Streptomyces*-kantoja, jotka ovat antagonistisia *S. scabies* -bakteerille. Kenttäkokeissa antagonistiset *Streptomyces*-kannat vähentävät perunarupibakteerin aiheuttamia oireita pienentämättä mukulasadon määrää. Antagonismin mekanismia ei ole vielä selvitetty, mutta antibioottien tuotannon epäillään olevan yksi vaikuttava tekijä (LIU 1992, LIU ym. 1995). Lisäksi *Streptomyces albidoflavus* Hayashida ym. ja *Streptomyces diastatochromogenes* (Krainsky) Waksman & Henrici -sädebakteerit tuottavat antibiootteja, joiden on havaittu olevan tehokkaita perunaruven biotorjunta-aineita (HAYASHIDA ym. 1988, HAYASHIDA ym. 1989, EKWALL & SCHOTTEL 1997). Myös mukulan peittaamista bakteereilla on testattu (TANII ym. 1990).

Perunan varastokokeissa on havaittu turvekäsittelyn heikentävän perunarupipatogeenien elävyyttä kuuden kuukauden varastoinnin jälkeen. Näissä turpeella käsitellyissä mukuloissa ei esiinny ruven siemenlevintää. Turpeen antagonisteilla epäillään olevan vaikutusta rupibakteerien elinkykyyn rupilaikuissa (LEHTONEN ym. 2003).

2.3 Antagonistiset *Streptomyces*-sädebakteerit

2.3.1 Antagonismi ja sen mekanismit

Kasvitautilien torjunnassa käytettyjä torjuntapieneliöitä kutsutaan antagonisteiksi. Antagonismiksi kutsutaan tapahtumaa, jossa torjuntapieneliö aiheuttaa vahinkoa toiselle pieneliölle (CAMPBELL 1989). Antagonismin mekanismit voidaan jakaa neljään ryhmään.

a. Antibioosi ja entsyymit

Antagonistit haittaavat muiden pieneliöiden elämää tuottamalla hajottavia entsyymeitä tai antibiootteja. Antibioosissa antagonistin aineenvaihduntatuote, antibiootti, tappaa tai ehkäisee kasvitaudinaiheuttajan kasvun. Antibiootit vaikuttavat hyvin pieninä pitoisuuksina ja niiden vaikutus rajoittuu antagonistin läheisyyteen (CAMPBELL 1989).

b. Kilpailu

Pieneliöillä kilpailua esiintyy ravinteista, pääasiassa hiilen ja typen lähteestä, hapestasta, tilasta ja valosta. Juurivyöhykkeessä pieneliöiden kasvua rajoittaa kilpailu juurieritteistä, ravinteista ja tilasta. Juurella kasvavien pieneliöiden massa on vakio huolimatta siitä mikä on pieneliöiden lukumäärä, jos pieneliöt käyttävät samoja ravinteita. Mikrobit eivät kilpaile varsinaisesti vedestä, vaan kasvupaikasta, jossa on kullekin lajille sopivat kosteusolosuhteet (CAMPBELL 1989).

c. Loisiminen

Hyperparasitismiksi kutsutaan ilmiötä, jossa torjuntapieneliöt loisivat kasvitaudinaiheuttajissa. Loiset tuottavat entsyymeitä, kitinaasia ja sellulaasia, joiden avulla ne hajottavat soluja ravinnokseen (CAMPBELL 1989). Hyperparasitismi, erityisesti mykoparasitismi, on yleistä kasvien juuristoalueella (CURL & TRUELOVE 1986).

d. Isäntäkasvin kasvun parantaminen

Jotkut pieneliöt parantavat kasvien kasvua ja siten vähentävät kasvitautilien oireita (CAMPBELL 1989).

2.3.2 Sädebakteerit antagonisteina

Sädebakteerit estävät patogeenien kasvua erittämiensä aineenvaihduntatuotteiden avulla. Esimerkiksi *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* tuottaa maassa geldamyssiini nimistä antibioottia, joka estää *Rhizoctonia solani* Kühn -sienen kasvun maassa (ROTHROCK & GOTTLIEB 1984). Lisäksi sädebakteerit kykenevät hajottamaan patogeenien soluseiniä erittämiensä entsyymien avulla sekä osin myös loisimaan tautisienillä (LAHDENPERÄ 1995). Sädebakteerit tuottavat soluseiniä hajottavia entsyymejä, kuten kitinaasia, sellulaasia, amylaasia ja 1,3- β -glukanaasia (BEYER & DIEKMANN 1985, HOPWOOD 1990).

Antibioottien tuoton on havaittu useilla sädebakteereilla liittyvän itiöintiin. Tästä ovat todisteena mutantit, jotka eivät pysty tuottamaan antibiootteja eivätkä ilmarihmoja, joissa itiöt muodostuvat (GINTHER 1979). Sädebakteerien antibioottien tuotannosta luonnonoloissa on vähän todisteita, vaikka niiden tiedetään varmasti tuottavan antibiootteja ravintoalustalla (LAHDENPERÄ 1987).

Turpeesta eristetyillä *Streptomyces* kannoilla on todistetusti voimakkaita antagonistisia ominaisuuksia useita sienipatogeeneja vastaan (TAHVONEN 1982b). Näistä kannoista biologisen torjuntatehon omaavat *Streptomyces*-bakteerit muodostavat laboratorio-olosuhteissa kasvatettaessa polyeeniantibiootteja (RAATIKAINEN ym. 1993).

Turpeesta eristetyillä *Streptomyces*-kannoilla on saatu hyviä tuloksia salaatin *Lactuca sativa* (L.) harmaahometta vastaan. Harmaahomeen aiheuttamat sadonmenetykset pienenevät huomattavasti, kun kasvuturve käsitellään *Streptomyces*-itiösuspensiolla (TAHVONEN & LAHDENPERÄ 1988).

Siementen käsittely *Streptomyces*-bakteereilla lisää viljojen satoa ja estää tai vähentää *R. solani* ja *Alternaria brassicola* (Schwein.) Wiltshire -sienten aiheuttamaa taimipoltetta ristikukkaisilla. Sädebakteerit ovat tehokkaimpia kun kasvu- alustana on käytetty turvetta, mutta hyviä tuloksia on saatu myös hienossa hiekassa ja savimaassa (TAHVONEN 1988).

Sädebakteerit toimivat juurten pinnalla ja niiden välittömässä läheisyydessä. Pyyhkäisyelektronimikroskooppitutkimukset (SEM) osoittavat, että *Streptomyces griseoviridis* Andersson et al. on joidenkin patogeenisten sienien hyperparasitti, sillä se loisii sienien rihmoilla. *S. griseoviridis* ympäröi mm. *Alternaria*-kuromat ja *Sclerotinia*-rihmat tiiviisti samalla hajottaen niitä. Sädebakteeri kasvaa

monien sienipatogeenien rihmoilla liuottaen niitä. *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *Dianthi* (Prill. & Dol) Snyd. & Hans. –sienen kasvua *S. griseoviridis* estää heikosti ja *R. solani* ja *Pythium* –sienten rihmoilla ja munaitiöllä se kasvaa löyhästi, kuitenkin niitä vioittamatta (TAPIO & POHTO-LAHDENPERÄ 1991).

Streptomyces-lajit asuttavat uuden kasvualustan hitaammin kuin muut bakteerit ja sienet (LACEY 1973). Jos *S. griseoviridis* -biotorjuntaeliöitä ei ole kasvualustassa kylvöhetkellä, se kilpailee heikosti muiden mikrobien kanssa. Tästä päätellen kilpailu ei ole *S. griseoviridis* -sädebakteerin antagonismimekanismi (KORTEMAA ym. 1997b). Antibioottien tuotto onkin sädebakteerien tärkein antagonistinen ominaisuus, sillä hidaskasvuisuutensa vuoksi ne ovat heikompia kilpailijoita kuin useimmat muut bakteerit ja sienet (LLOYD 1969).

2.3.3 *Streptomyces griseoviridis* -sädebakteeri

TAHVONEN (1982a) eristi biologisessa torjunnassa käytetyn *S. griseoviridis* -sädebakteerin turpeesta. *S. griseoviridis* selviytyy ja lisääntyy juurettomassa maassa, jossa on hyvin vähän orgaanista materiaalia (KORTEMAA ym. 1997a). Bakteerit jotka selviytyvät maassa, jossa ei ole kasvien juuria, ovat potentiaalisia biotorjuntaeliöitä (BAHME & SCHROTH 1987).

S. griseoviridis -bakteerilla on antagonistisia ominaisuuksia muun muassa seuraavia kasvipatogeenien vastaan; *Alternaria brassicola*, *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium avenaceum* (Fr.:Fr) Sacc., *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Pythium debaryanthum* auct. Non Hess., *Phomopsis sclerotioides* van Kesteren, *Rhizoctonia solani* ja *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary (TAHVONEN 1982 a, b, TAHVONEN & AVIKAINEN 1987, TAHVONEN & LAHDENPERÄ 1988).

S. griseoviridis -bakteerin vaikutukset ovat erilaiset eri kasveille (LAHDENPERÄ 1995). Bakteerin antagonistinen vaikutus johtuu antibioosista (RAATIKAINEN 1990) tai loisimisesta (TAPIO & POHTO-LAHDENPERÄ 1991). *S. griseoviridis* -käsittelyjen on todettu taudintorjunnan lisäksi parantavan kasvua ja lisäävän satoa terveessäkin kasvustossa (TAHVONEN 1988). Esimerkiksi kurkulla se parantaa lehvästön kuntoa ja kurkunhärmän [*Sphaerotheca fuliginea* (Schlechtend.:Fr.) Pollacci] ilmentyminen saattaa siirtyä myöhemmäksi. *S. griseoviridis* tuot-

taa kasvuhormonia, auksiinia (IAA) (TAHVONEN 1988, TUOMI ym. 1994 ja LAHDENPERÄ 1995), jonka on todettu edistävän solunjakautumista ja juurten kasvua (SCOTT 1972).

Verdera Oy valmistaa Mycostop® biotorjunta-ainetta *S. griseoviridis* –bakteerin itiöistä ja solurihmoista. Biotorjunta-ainetta käytetään muutamien siemen- ja maalevintäisten kasvitautien torjuntaan (TAHVONEN 1988). Tulokset *S. griseoviridis* –biotorjuntaeliöllä peittauksen tai maalevityksen välillä vaihtelevat riippuen kasvista. Tomaatille (*Lycopersicon esculentum* Miller) ja kukkakaalille (*B. oleracea* var. *botrytis* L.) sopii paremmin peittaus. Maalevityksellä taas saadaan parempia tuloksia kurkulla (*Cucumis sativus* L.) ja gerberalla (*Gerbera x cantabrigensis* Lynch) (EL-ABYAD ym. 1993, MOHAMMADI & LAHDENPERÄ 1994). Ajoitus ja oikea käsittelytapa ovat tärkeitä *S. griseoviridis* –biotorjuntaeliötä käytettäessä (KORTEMAA ym. 1997b).

2.3.4 Muita *Streptomyces*-suvun antagonistreja

Sianlannasta eristetty *Streptomyces albiflavus* tuottaa *S. scabies* –patogeenin kasvua ehkäisevää antibioottia. Perunarupea ei esiinny lainkaan *S. albiflavus* –sädebakteeria sisältävällä kompostoidulla sianlannalla lannoitettaessa (0,1 g N/4 kg maata) (HAYASHIDA ym. 1988, HAYASHIDA ym. 1989).

Kahden sädebakteerikannan on todistettu estävän perunarupea myös kenttäkokeissa. Nämä kannat, *S. diastatochromogenes* PonSSII ja *S. scabies* PonR, eivät ole patogeenisia ja ne tuottavat antibioottia *S. scabies* –bakteeria vastaan. Molemmat antagonistiset kannat ehkäisevät perunarupea merkittävästi. Keskimääräinen taudin vähennys kannalla PonSSII on 73 % ja kannalla PonR 64 % verrattuna kontrolliin. Mukulasatoon käsittelyillä ei ole merkittävää vaikutusta (LIU 1992, LIU ym. 1995, LORANG 1988).

Myös tomaatin tautien torjuntaan on kokeiltu *Streptomyces spp.* –suvun antagonistreja. *Streptomyces pulcher* Waksman ja *Streptomyces canescens* Waksman estävät *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersi* Schlechtend: fr., *Verticillium alboatrum* Reinke & Bethier- ja *Alternaria solani* (Sacc) Snyder & Sorauner -sieni-itiöiden itämistä, sienirihmojen kasvua ja itiöiden tuottoa. Tomaatin bakteeritaudeilla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. ja *Pseudomonas so-*

lanaceaum Smith parhaita torjuntatuloksia on saatu *S. pulcher* ja *Streptomyces citreofluorescens* (Korenyako ym.) Pridham –sädebakteereilla. Kenttäkokeissa parhaimmat torjuntatulokset on saatu menetelmällä, jossa tomaatin siemenet käsiteltiin antagonistin itiöillä ennen kylvöä. Tämän on todettu parantavan myös tomaatin kasvua (EL-ABYAD ym. 1993).

Streptomyces lydicus De Boer ym. on osoittanut ravintoalustakokeissa lupaavaa antagonismia useita sienipatogeeneja vastaan tuottamallaan antifungaalisilla aineenvaihduntatuotteilla (YUAN & CRAWFORD 1995). *S. griseus* tuottaa useita antibiootteja ja on osoittautunut antagonistiseksi mm. hollanninjalavatautia aiheuttavaa sientä *Ceratocystis ulmi* (Buisman) Moreau vastaan (OBRIEN ym. 1984). *S. griseus* var. *autotrophicus* tuottaa antibioottia nimeltä faeriefungin, joka estää jo pienillä pitoisuuksilla *Fusarium* -lajien kasvun (NAIR ym. 1989). Muun muassa *Streptomyces hygroscopius* var. *geldanus* –antagonistin tuottama geldamysiini estää herneellä *R. solani* –sienen aiheuttamaa taimipoltetta (ROTHROCK & GOTTLIEB 1984).

Herneelle (*Pisum sativum* L.) *S. hygroscopius* var. *geldanus* aiheuttaa kasvun hidastumista sekä lieviä värimuutoksia kasvin maanalaisiin osiin. Kun antagonistin levitetään kasvualustaan kaksi vuorokautta ennen kylvöä, ei isäntäkasvin kasvu hidastu merkittävästi mutta patogeenin kasvu estyy (ROTHROCK & GOTTLIEB 1984). *Streptomyces griseus* (Krausky) Waksman & Henrici var. *autotrophicus* –antagonistin on todettu olevan myrkyllinen *Asparagus*-suvun kasveille, kun taas antagonistin tuottama antibiootti, faeriefungin, stimuloi parsan (*Asparagus officinalis* L.) kasvua (SMITH ym. 1990).

2.4 Sädebakteerit juurivyöhykkeessä

Aluetta, jossa mikrobit ovat elävien juurien vaikutusalueella, kutsutaan ritsosfääriksi (CURL & TRUELOVE 1986), juurivyöhykkeeksi. Se tarjoaa mikrobeille erilaisen kasvuympäristön mm. juurieritteineen kuin maa juurten ulottumattomissa. pH juurivyöhykkeessä voi vaihdella 1-2 yksikköä juurivyöhykkeen ulkopuoliseen maahan verrattuna. Bakteereita ja sieniä kasvaa juurivyöhykkeessä 5-20 ja sädebakteereita 2-12 kertaa enemmän kuin juurialueen ulkopuolella (CURL & TRUELOVE 1986). Mikrobit, jotka pystyvät selviytymään ja lisääntymään maassa juurivyöhykkeessä,

ovat potentiaalisia biologisia torjuntaeliöitä maaperän patogeenejä vastaan (WELLER 1998).

Bakteerit, jotka selviytyvät sterilisoimattomassa kasvualustassa, asuttavat juurivyöhykkeen tehokkaasti, sillä sterilisoimattomassa kasvualustassa bakteerit joutuvat kilpailemaan elintilastaan. Sterilisoimattomassa kasvualustassa selviytymisen avain on alkuperäisen tartukkeen määrä, sillä bakteereiden kasvutiheys juurivyöhykkeessä on suoraan verrannollinen tartukkeen määrään (HATZINGER & ALEXANDER 1994). Steriloidussa kasvualustassa bakteerit saavuttavat nopeasti tietyn populaatiitiheyden juurivyöhykkeessä ja säilyttävät sen, riippumatta tartukkeen määrästä (BENNET & LYNCH 1981a). Toinen bakteerikantojen tiheyteen juurivyöhykkeessä vaikuttava tekijä on hiilen määrä. Kun bakteeri saavuttaa maassa juuren, alkaa kilpailu mikrobien kesken kasvien juurieritteistä hiilen lähteeksi (BENNET & LYNCH 1981b).

Sädebakteeripopulaatiot vaihtelevat kasvukauden aikana niin perunan juurivyöhykkeessä, mukulan pinnalla kuin ympäröivässä maassakin (KEINATH & LORIA 1989b, VRUGGINK 1976). Tähän saattaa vaikuttaa perunan erittämien juurieritteiden määrän vaihtelu, maan pH:n ja kosteuden muutos sekä juurien ottaman veden ja ravinteiden määrän vaihtelu (KEINATH & LORIA 1989b). Myös viljelykasvilla on vaikutusta sädebakteeripopulaatioon. Eri viljelykasvimaista löytyy eri sädebakteereja ja vielä niin, että juurivyöhykkeessä esiintyy eri lajeja kuin ympäröivässä maassa (VRUGGIK 1976).

Sterilisoimattomassa juurivyöhykkeen ulkopuolisessa hiekassa *S. griseoviridis* -sädebakteerin määrä kasvaa 14 vuorokauden kasvatusaikana huomattavasti. Kylvöpäivänä sädebakteerin keskimääräinen pesäkelukumäärä grammassa hiekkaa oli 1.3×10^2 kpl ja kahden viikon kuluttua 1.9×10^5 kpl. Eroja eri juuristosyvyyksissä ei ole ja populaatiot ovat juurivyöhykkeessä suurempia kuin juurivyöhykkeen ulkopuolella ja juurettomassa hiekassa. *S. griseoviridis* pystyy kilpailemaan juurivyöhykkeessä maaperän kotoperäisten mikrobien kanssa, jos sitä lisätään maaperään viimeistään kylvön yhteydessä. Se pystyy selviytymään ja lisääntymään myös sterilisoimattomassa maassa, jossa ei ole juuria (KORTEMAA ym. 1997a).

3 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tässä työssä tutkittiin niitä *Streptomyces*-kantojen ominaisuuksia, joita tarvitaan biologisen torjunnan välineeksi erityisesti perunaruven torjunnassa. Tavoitteena oli luonnehtia suomalaisilta perunanviljelysalueilta eristettyjä *Streptomyces* -bakteereita ja tutkia kantojen keskinäisiä vuorovaikutuksia. Työssä oli mukana perunarupea aiheuttavia ja perunarupea aiheuttamattomia *Streptomyces*-kantoja. Tavoitteena oli löytää kanta tai kantayhdistelmä, joka olisi ominaisuuksiltaan potentiaalinen biologisen torjunnan väline kaikkia suomailasia perunarupipatogeeneja vastaan.

Tärkeitä kriteereitä antagonistille oli kaksi: kannan tulee estää tehokkaasti patogeenien kasvu eikä se saa estää muiden antagonistien kasvua. Lisäksi kannan tulee viihtyä samoissa pH-oloissa kuin patogeenin (LIU ym. 1996). Tutkimuksen tavoitteena oli testata pH:n vaikutus kantojen kasvuun ja estokykyyn, kantojen kyky estää toisten kantojen kasvu ja kyky sietää toisten kantojen estovaikutusta.

Tutkimuksen pitkän tähtäimen tavoite on selvittää mekanismi, jolla antagonistiset kannat saavat aikaan tasaisen, pitkä-aikaisen torjuntatuloksen ja käyttää tätä tietoa hyväksi kehitettäessä tehokasta biologista torjuntakeinoa perunaruvelle.

Tutkimushypoteesit olivat:

1. Eri *Streptomyces*-kannoilla on erilaiset pH-olosuhdeoptimit
2. Rupea aiheuttamattomat kannat ehkäisevät perunaruvenaiheuttajien kasvun, mutta eivät ehkäise toisten rupea aiheuttamattomien kantojen kasvua.
3. Rupea aiheuttamattomat kannat sietävät toisten kantojen estoaineita
4. *S. griseoviridis* ehkäisee perunaruven aiheuttajien kasvua.
5. *S. griseoviridis* ja muut rupea aiheuttamattomat kannat estää *Helminthosporium solani* ja *Rhizoctonia solani* -sienten kasvua.
6. Rupea aiheuttamattomat mahdolliset antagonistit asuttavat perunan juurivyöhykkeen.
7. Melaniinia tuottavat *Streptomyces*-kannat pystytään erottamaan TNC-kasvatusalustalla tuottamansa väriaineen perusteella *Streptomyces*-kannoista, jotka eivät tuota melaniinia.

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Bakteerikannat

Kokeissa oli mukana 25 *Streptomyces* spp. -sädebakteerikantaa, joiden antagonismia testattiin perunarupibakteereita sekä harmaahilsesientä (*Helminthosporium solani* Dur. & Mont.) ja perunaseittisientä (*Rhizoctonia solani*) vastaan (Taulukko 1).

Taulukko 1. *Streptomyces* -sädebakteerikannat, kantojen ryhmittely ja alkuperä.

Kanta	Ryhmä ^a	Patogeenisuus	Alkuperä ^b
53	1a	kyllä	Tyypikanta ATCC 49173
267	1a	kyllä	Sotkamo, HPP
271	1a	ei	Tyrnävä, HPP
272	1a	ei	Tyrnävä, HPP
333	1a	kyllä	Lumijoki, HPP
273	1b	ei	Tyrnävä, HPP
346	1b	ei	Tyrnävä, HPP
250	4	ei	Apukka, HPP
251	4	ei	Apukka, HPP
253	4	kyllä	Apukka, HPP
259	4	ei	Apukka, HPP
268	4	kyllä	Sotkamo, HPP
283	4	kyllä	Mikkeli, HPP
287	4	kyllä	Mikkeli, HPP
277	5	ei	Tyrnävä, HPP
316	5	kyllä	Loimaa, HPP
317	5	kyllä	Loimaa, HPP
319	5	kyllä	Loimaa, HPP
A1	em	ei	Mansikka, Pohto-Lahdenperä
T5	em	ei	Turve, Hanna Kortemaa
6I	em	ei	Metsämaa, Hanna Kortemaa
16II	em	ei	Metsämaa, Hanna Kortemaa
16IV	em	ei	Metsämaa, Hanna Kortemaa
Antipin a	em	ei	Peruna, Jyri Kankila
<i>S. g</i>	em	ei	Mycostop, Kemira Oy

S. g.; *Streptomyces griseoviridis*

^a: 1a ja 1b: Tyypikanta *S. scabies*, 4: Tyypikanta *S. turgidiscabies*, 5: Tyypikanta *S. aureofaciens*, em: ei määritetty

^b: Isolaatit HPP ja tyypikanta ATCC49173 peräisin perunasta, Helsingin yliopiston kasvipatologian laitoksen kokoelmat (LINDHOLM ym. 1997, YLHÄINEN 2001).

Näistä 25 kannasta valittiin 8 kantaa jatkokokeisiin sillä perusteella, että tutkimukseen pyrittiin sisällyttämään perunarupilaikuista eristettyjä tavallisen ja pohjanrupibakteerin kantoja, rupea aiheuttavia ja rupea aiheuttamattomia lajeja, sekä joidakin muualta peräisin olevia sädebakteerilajeja (Taulukko 2).

Streptomyces griseoviridis –kantaa (Kemira Agro Oy [nyk. Verdera], Mycostop®) käytettiin referenssikantana antagonismin osoituksessa. Sitä lisättiin kokeita varten ravintoalustalla. *H. solani* ja *R. solani* -sienet oli Hanna Kortemaa eristänyt perunasta Kasvintuotannon tarkastuskeskuksen siementarkastusosastolla. *Streptomyces*-kannat olivat peräisin Helsingin yliopiston kasvipatologian laitoksen kokoelmista.

Streptomyces-kannat oli ryhmitelty fysiologisten ominaisuuksien perusteella seitsemään ryhmään (LINDHOLM ym. 1997). Kokeissa oli mukana neljään ryhmään kuuluvia kantoja sekä kantoja joita ei ole ryhmitelty. Ryhmien 1a ja 1b tyyppikanta on *S. scabies*. Ryhmän 4 tyyppikanta on *S. turgidiscabies* ja ryhmän 5 *S. aureofaciens* (Taulukko 1).

Tutkimuksen kuluessa kannat 268 ja 253 osoittautuivat patogeenisiksi, vaikka minimukulatestit eivät aiemmin osoittaneet merkkejä patogeenisuudesta. Kasvihuoneessa tehdyissä kokeissa kannat aiheuttivat rupea ja lisäksi tuottivat runsaasti takstomiineja (YLHÄINEN A. 1999, sähköpostiviesti kirjoittajalle).

4.2 Kasvatusalustat

Bakteeri- ja sienikantoja kasvatettiin kasvatusalustoilla, jotka tehtiin muovisille säteilyttämällä steriloiduille petrimaljoille (Sterilin 90*15 mm)

Glukoosi-hiiva-mallasagar (GYM)

4 g glukoosi (D-, E. Merck)

4 g hiivauute (Biokar)

10 g mallasuutetta (Biokar)

20 g agaria (Biokar)

1000 ml tislattu vesi

pH-säädetty GYM

Materiaalit kuten edellä glukoosi-hiiva-mallasagareissa. pH säädettiin laminaarissa 1.0 M NaOH:lla tai 1.0 HCl:llä. Autoklavoinnin jälkeen kuumasta agarliemestä otettiin näyte, josta mitattiin pH. Tarpeen mukaan pH säädettiin ja tarkistettiin ottamalla uusi näyte.

Sellofaanikalvomaljat pH 6.5

Glukoosi-hiiva-mallasagar (GYM)

Sellofaanikalvo (Visella 400p Ø 8 cm)

Sellofaanikalvot autoklavoitiin (15 min +131 °C 1 bar) lasisissa petrimaljoissa. Kalvojen väliin aseteltiin pyöreät kalvojen kokoiset imupaperit, jotta kalvot eivät olisi autoklavoinnissa liimautuneet toisiinsa kiinni. Kalvot aseteltiin valmiiden GYM-alustojen pinnalle pinseteillä, jotka oli kastettu 70 % etanoliin ja liekitetty.

Vesiagar-glyserolimaljat

16 g agar (Biokar)

1000 ml tislattu vesi

5 ml 85 % glyseroli

Tyrosiini-kaseiini-nitraattiagar (TCN)

25 g natriumkaseinaatti (Sigma)

10 g NaNO₃ (RDH Labor)

1 g L-tyrosiini (Sigma)

1000 ml tislattu vesi

Perunadekstroosiagar (PDA)

39 g PDA jauhe (Difco)

1000 ml tislattu vesi

Maissiagar

17 g maissiagarjauhetta (Difco)

1000 ml tislattu vesi

Kaikkia kasvatusalustoja valmistettaessa tarvittavat aineet punnittiin 1500 ml erlenmayerpulloon ja sekoitettiin ennen autoklavointia (15 min +131 °C 1 bar). Ravintoliuosta kaadettiin yhdelle petrimaljalle noin 50 ml.

Hiekka

Juurenasutuskykykokeessa perunan kasvualustana käytettiin steriloimatonta hiekkaa (pH 6.7). Hiekan pH mitattiin CaCl_2 menetelmällä, jossa ilmakeivaan hiekkaan (20 ml) lisättiin 50 ml CaCl_2 (0,01M). Seosta sekoitettiin sekoittajassa vuorokausi, jonka jälkeen vesi suodatettiin ja siitä mitattiin pH.

4.3 Laitteet ja apuvälineet

Stereomikroskooppi: Heerbugg Wild M5A

Autoklaavi: Santasalo-Sohlberg ab tyyppi 34-E

pH-mittari: Schott pH-meter cg 840

Koeputkisekoittaja: Heidolh Reax 2000

Laminaari: Kojais tyyppi K-Safety

Vaaka: Metler PM 200

4.4 Sädebakteerien kyky estää sienten kasvua

Kokeessa testattiin viiden rupea aiheuttamattoman sädebakteerin kyky estää kahden maalevintäisen (*R. solani* ja *H. solani*) sienitaudinaiheuttajan kasvu. Perunaseittisieni (*R. solani*) siirrostettiin PDA-kasvualustalle, harmaahilsesieni (*H. solani*) maissiagaralustalle ja sädebakteerit GYM-alustoille (pH 6.5) suspensiona (100 µl), joka levitettiin kasvatusalustaan liekitetyllä lasikolmiolla. Suspensio oli tehty raaputtamalla täyteen kasvaneilta maljoilta kasvustoa eppendorf-putkiin, jonka jälkeen putkeen lisättiin steriiliä vettä ja sekoitettiin huolellisesti koeputkisekoittajassa. Kasvustot kasvatettiin huoneenlämmössä (+18 °C ±1 °C) pimeässä noin 14 vuorokautta, jonka jälkeen kasvustoista leikattiin kiekot (Ø 6 mm) korkkiporalla.

Sädebakteeri lisättiin kasvatusmaljan toiselle reunalle omassa kasvualustakiekossaan (\varnothing 6 mm), joka oli otettu korkkiporalla täyteen kasvaneesta sädebakteerikasvualustasta. Sieni lisättiin kasvatusalustan toiseen reunaan omassa kasvualustakiekossaan. Kokeissa käytettiin kullekin sienelle sopivia kasvatusalustoja. Perunaseittisien kokeet tehtiin PDA-kasvualustoilla ja harmaahilsesienen kokeet maissiagaralustoilla. Kokeet tehtiin huoneenlämmössä ja mahdollinen muodostunut estovyöhyke (mm) mitattiin 14 vuorokauden kuluttua siirrostuksesta. Kontrollina kasvatettiin sienikiekoja puhtaalta kasvatusalustalta leikattujen kiekkojen kanssa.

4.5 pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun

Kokeessa haluttiin selvittää kasvualustan pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun. Kaikki yhdeksän kantaa kasvatettiin pH-säädetyillä GYM-alustoilla pH-arvoilla 5.5, 6.5 ja 8.0. Bakteereita kasvatettiin ensin noin 14 vuorokautta huoneenlämmössä (+18 °C) pimeässä. Bakteerikasvustoista tehtiin saastukesuspensio kuten edellä ja suspensiosta tehtiin laimennossarja. Laimennossarja aloitettiin sekoittamalla 1 ml saastukesuspensiota 9 ml steriiliä vettä, josta valmistettiin laimennossarja 10^{-2} – 10^{-5} (1 ml laimennosta +9 ml steriiliä vettä). Laimennoksia pipetoitiin kasvualustalle 100 μ l ja levitettiin liekitetyllä lasisauvalla. Jokaisesta kannasta laitettiin kasvamaan laimennokset 10^{-3} – 10^{-5} , kolme maljaa kutakin kolmeen pH -arvoon. Eli yhteensä yhtä kantaa laitettiin kasvamaan kerralla 27 maljalle. Maljoja ei suljettu ilmatiiviisti. Bakteerien kasvua ja itiöimistä tarkasteltiin 14 ja 21 vuorokauden kuluttua siirrostuksesta mikroskopoimalla ja laskemalla bakteerien keskimääräiset pesäkelukumäärät (CFU-arvot). Tällä menetelmällä sädebakteerimäärä alle 10^2 cfu 0,1 ml:ssa saastukesuspensiota ei pystytä määrittämään. Pesäkelukumäärä antaa tietoa bakteerikantojen kasvukykyvystä tietyssä pH:ssa. Itiöiminen arvioitiin silmämääräisesti runsaaksi, heikoksi tai puuttuvaksi. Runsasta itiöinti oli, kun jauhomainen kasvusto peitti kasvualustan kokonaan, ja heikkoa, kun kasvusto peitti maljan vain osittain.

Taulukko 2. Sädebakteerikannat, kantojen ryhmittely ja alkuperä.

Kanta	Ryhmä ^a	Patogeenisuus	Melaniini	Alkuperä
16IV	Em	Ei	Ei	Metsämaa
<i>S. g.</i> ^b	Em	Ei	Kyllä	Turve
253	4	Ei	Ei	Peruna: Apukka
268	4	Ei	Ei	Peruna: Sotkamo
267	1a	Kyllä	Kyllä	Peruna: Sotkamo
287	4	Kyllä	Ei	Peruna: Mikkeli
346	1b	Ei	Kyllä	Peruna: Tyrnävä
53	1a	Kyllä	Kyllä	Peruna: USA
316	5	Kyllä	Ei	Peruna: Loimaa

^a Em, ei määritetty

^b *S.g.*, *Streptomyces griseoviridis*

4.6 Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovaikutukset

Kolmella erilaisella koejärjestetyllä selvitettiin taulukossa 2 esiteltujen kantojen keskinäiset estovaikutukset.

4.6.1 Estovaikutus eri pH-oloissa

Yhdeksän kannan (Taulukko 2) vaikutusta toisiinsa arvioitiin kaikilla mahdollisilla pariyhdistelmillä. Estovaikutukset tutkittiin kasvatusalustoilla, joita oli kolmea eri pH:ta (5.5, 6.5 ja 8.0). Koe tehtiin kahdesti käyttäen kolmea kerrannetta.

Kokeessa estettävä bakteerikanta levitettiin vesisuspensionä (100 µl) maljalle liekitetyllä lasisauvalla. Maljan keskelle asetettiin korkkiporalla leikattu kiekko (Ø 6 mm) estävää bakteerikasvustoa. Kasvustot, joista korkkiporakiekkot leikattiin, kasvatettiin huoneenlämmössä (+18°C ±1°C) pimeässä pH:ssa 6.5 GYM-alustoilla noin 14 vuorokautta. Kontrolleina käytettiin bakteerisuspensiomaljaa ilman estokiekkoa. Estokiekkon aiheuttama mahdollinen estovyöhyke mitattiin 14 vuorokauden kuluttua siirrostuksesta. Estovyöhykkeellä tarkoitettiin vyöhykettä kasvualustakiekkon ja estettävän bakteerin kasvuston välille, jolla bakteerit eivät kasvaneet. Ko-

keen tulokset testattiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä, jossa kahden koekeerran tulokset oli yhdistetty.

4.6.2 Kasvualustaan imeytyvät estoaineet

Kokeessa oli tarkoitus selvittää sädebakteerikantojen tuottamien estoaineiden imeytymistä sellofaanin läpi kasvualustaan ja aineiden vaikutusta toisten sädebakteerikantojen kasvuun aiemmin kuvattua menetelmää mukaillen (DENNIS & WEBSTER 1971). Kaikki taulukossa 2 luetellut kannat testattiin toisiaan vastaan. Estävä bakteerisuspensio (100 µl) levitettiin kalvon pinnalle saastukesuspensiona liekitetyllä lasikolmiolla ja viljelmiä kasvatettiin 14 vrk huoneenlämmössä ($+18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) pimeässä. Seuraavaksi kalvo poistettiin maljalta steriloiduin pinsetein ja estettävä bakteeri levitettiin maljalle vesisuspensiona (100 µl). Kontrollina kasvatettiin estettävä bakteeri sellofaanimaljalla, josta puhdas kalvo oli poistettu. Maljojen pH oli säädetty bakteereille suotuisaksi (pH 6.5). Saastukesuspensiot tehtiin noin 14 vrk vanhasta kasvustosta, joka oli kasvanut GYM-maljalla.

Maljoilta laskettiin bakteeripäkkeiden lukumäärät 14 vuorokauden kulluttua jälkimmäisen kannan siirrostuksesta. Käsittelylle tehtiin kolme kerrannetta ja koesarja tehtiin kahdesti. Tilastolliset testit tehtiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä.

4.6.3 Seoskasvatus

Kokeessa oli tarkoitus pyrkiä selvittämään eri kantojen vaikutus toisten kantojen kasvuun. Melaniinia tuottavat kannat kasvatettiin melaniinia tuottamattomia kantojen kanssa samalla kasvualustalla. Melaniinia tuottavia kantoja ovat ryhmien 1a ja 1b kannat. Esikokeessa tutkittiin kantojen 161V ja *S. griseoviridis* melaniinintuotto. Aikaisempaa raportoitua tietoa näiden kantojen melaniinin tuotosta ei ollut. Melaniinia tuottavat kannat erottaa niiden kasvatusalustalle muodostaman tummanruskean värin perusteella. Testattavista kannoista siirrostettiin molemmista 50 µl saastukesuspensiota TCN-maljalle ($2 \times 50\text{ }\mu\text{l}$), jonka jälkeen saastukkeet levitettiin tasaisesti liekite-

tyllä lasikolmiolla. Saastukkeina käytetyt kasvustot olivat noin 14 vrk vanhoja ja ne oli kasvatettu GYM- alustoilla huoneen lämmössä ($+18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) pimeässä. Kontrollina käytettiin kantaa siirrostettuna yksin (100 μl) TCN-maljalle. Kasvatus tapahtui huoneenlämmössä. Tulosten havainnoinnissa laskettiin erikseen melaniini-väriä tuottaneet pesäkkeet ja värittömät pesäkkeet. Pesäkkeiden väriä ja lukumäärää havainnointiin 14 ja 21 vuorokauden kuluttua siirrostuksesta. Pesäkkeitä muodostavien yksiköiden (colony forming units, CFU) lukumääristä laskettiin keskimääräinen pesäkelukumäärä.

4.7 Juurenasutuskyky

Estovaikuttajina tehokkaan sädebakteerin *S. griseoviridis* ja rupea aiheuttamattomien pohjanrupibakteerikantojen 253 ja 268, sekä tuntemattoman kannan 346 kykyä asuttaa perunan juuret testattiin kasvihuoneoloissa. Perunoita saastutettiin sädebakteereilla istutusvaiheessa. Perunalajikkeena kokeissa oli ”Matilda”. Saastukkeita kasvatettiin noin 14 vrk huoneenlämmössä ($+18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) pimeässä keinokasvatusalustalla (GYM, pH n. 6.4). Saastukesuspensio tehtiin 500 ml:aan ioninvaihtovettä, johon raaputettiin sädebakteeria kolmelta täyteen kasvaneelta kasvualustalta. Suspensiosta tehtiin laimennossarja, kuten kokeessa ”pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun” ja suspensiolle laskettiin cfu-arvot. Perunoista koverrettiin pariisinperunaraudalla palloja, joihin jokaiseen jäi ainakin yksi itu. Perunat istutettiin kennostoihin ($V=0,2\text{ dm}^3$) sterilisoimattomaan hiekkaan (8 kg), johon oli sekoitettu saastukesuspensio ja 500 ml ioninvaihtovettä. Vertailukohteena toimi puhtaalla ioninvaihtovedellä (1 l) kostutettu hiekka. Kasvihuoneessa perunoita kasvatettiin 14 vuorokautta hiekassa noin $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ asteen lämpötilassa. Lämpötila vaihteli ulkolämpötilan mukaan välillä $+18\text{--}+26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja valojakso oli 16 tuntia. Koekerroista neljäs ja kuudes jouduttiin uusimaan, koska kasvihuoneen teknisten vikojen vuoksi lämpötila huoneessa nousi yli $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Perunakasvustot pidettiin kosteina koko kasvatusajan. Kasvustoja kasteltiin tarvittaessa vesijohtovedellä.

Perunoita kasvatettiin seitsemänä eri kertana ja kullakin kerralla testattiin kaksi kantaa ja kontrolli. Kahden viikon kasvatuksen jälkeen molemmilla kannoilla saastutetuista perunoista otettiin sattumanvaraisesti kymmenen ja kontrollista

viisi testikasvia. Kasvien juuret (Kuva 1.) leikattiin steriilisti etanoliin (70 %) kastetulla ja liekitetyllä kirurginveitsellä, jonka jälkeen juuret jätettiin hetkeksi kuivumaan laminaariin puhtaalle petrimaljalle. Juuriin tarttunut hiekka otettiin talteen rapsuttamalla ja ravistelemalla juuria pinseteillä. Hiekattomat juuret laitettiin vesi-agar-glyserolimaljoille. Viljelmiä kasvatettiin 21 vuorokautta, jonka jälkeen tarkasteltiin mikroskopoimalla, löytyikö juurista sädebakteerikasvustoa (+/-).

Ilmakuivasta hiekasta tehtiin laimennossarja. Laimennossarja aloitettiin sekoittamalla 1 g hiekkaa 9 ml steriiliä vettä, josta valmistettiin laimennossarja 10^{-2} - 10^{-5} (1 ml laimennosta +9 ml steriiliä vettä). Laimennoksia pipetoitiin kasvualustalle 0,1 ml. Kasvualustana laimennossarjoissa käytettiin vesi-agar-glyserolimaljoja. Viljelmiä kasvatettiin huoneenlämmössä ($+18\text{ C}^{\circ} \pm 1\text{ C}^{\circ}$) pimeässä 21 vrk, jonka jälkeen määritettiin pesäkelukumäärät ja laskettiin sädebakteerin määrä hiekassa (pesäkettä/g hiekkaa). Tällä menetelmällä sädebakteerimäärää alle 10^2 cfu g^{-1} hiekkaa ei pystytty havainnoimaan.



Kuva 1. Juurenasutuskokeessa peruna kasvatti 14 vuorokaudessa komeat juuret.

4.8 Tilastolliset menetelmät

Tilastolliset analyysit suoritettiin SAS-ohjelmiston GLM-toiminnolla. Kaikissa testeissä käytettiin 5 % merkitsevyystasoa ($p > 0,05$) ja arvoja tarkasteltiin kaksisuuntaisella varianssianalyysillä (SAS-institute INC. 1992).

5 TULOKSET

5.1 Sädebakteerien kyky estää sienien kasvua

Mycostop®-valmisteen *Streptomyces griseoviridis* muodosti molemmille sienille suurimmat estovyöhykkeet. Myös rupilaikusta eristetyt tuntemattoman sädebakteerilajin 346 ja metsämaasta eristetyt tuntemattoman sädebakteerilajin 161V estovaikutus oli tehokas. Kantojen aiheuttamat estovyöhykkeet olivat laajoja ja hajonta kerranteiden välillä oli vähäistä (Taulukko 3).

Pohjanrupibakteerin kannat 253 ja 268 estivät sekä perunaseitin, että harmaahilseen kasvua, mutta Taulukosta 3 nähdään, että kantojen muodostamat estovyöhykkeet jäivät huomattavasti pienemmiksi verrattuna *S. griseoviridis* –bakteerin muodostamiin estovyöhykkeisiin.

Taulukko 3. Sädebakteerien kyky estää perunaseittiä aiheuttavan sienien (*Rhizoctonia solani*) ja harmaahilsettä aiheuttavan sienien (*Helminthosporium solani*) kasvua.

	Harmaahilse		Perunaseitti	
	Estovyöhyke ^a	s ^b	Estovyöhyke ^a	s ^b
16IV	10,7	2,1	6,7	0,8
Sg	16,5	2,7	10,5	1,0
253	0,8	1,2	0,5	0,5
268	2,8	1,6	1,2	1,9
346	10	2,7	6,2	1,5

^aEstovyöhyke keskiarvo kahden kokeen kolmesta kerranteesta millimetreinä, $n = 6$.

^bs = keskihajonta

5.2. pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun

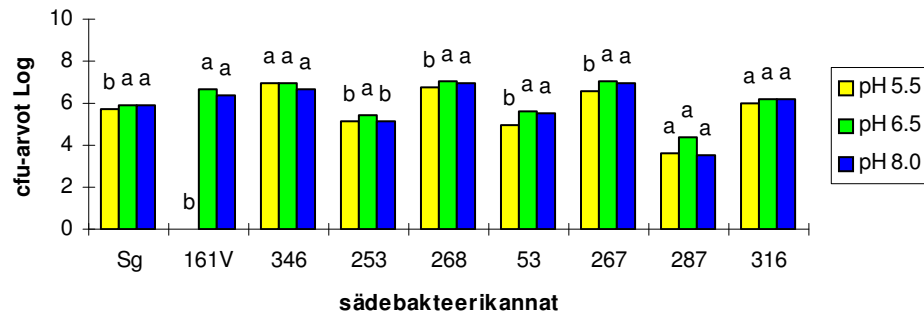
Taulukossa 4 on esitetty eri kantojen kasvu kussakin pH:ssa. Alimmassa pH:ssa (pH 5.5) kasvoivat kaikki muut paitsi kanta 16IV. Kanta 53 ei kasvanut kokeessa 2 ja kokeessa 1 kasvu oli heikompaa kuin korkeammilla pH arvoilla. Korkeammilla pH-tasoilla (6.5 ja 8.0) kaikki kannat kasvoivat hyvin (Taulukko 4).

Taulukko 4. Sädebakteerien kasvu (Cfu-arvot) kolmessa eri pH:ssa. Taulukossa kantojen kasvua verrataan toisiinsa tietyssä pH:ssa ja toisistaan eroavat kannat on merkitty eri kirjaimin. Parasta kasvua on merkitty kirjaimella a. Sarakkeet eivät ole keskenään verrannollisia. Kokeet 1 ja 2 testattiin erikseen. Pienin havainnoitu arvo 1.0×10^2 = ei kasvua.

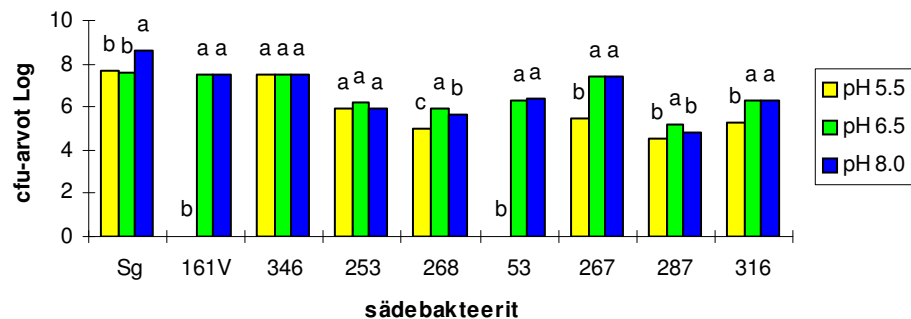
Laji*	Kanta (patog.)	Koe 1			Koe 2		
		pH 5.5	pH 6.5	pH 8.0	pH 5.5	pH 6.5	pH 8.0
Sg	Sg (-)	5.1×10^5 c	7.3×10^5 c	7.4×10^5 de	4.4×10^7 a	4.0×10^7 a	4.3×10^8 a
em	161V (-)	1.0×10^2 c	4.5×10^6 b	2.5×10^6 c	1.0×10^2 c	3.0×10^7 b	3.0×10^7 b
trb	53 (+)	9.4×10^4 c	4.4×10^5 c	3.3×10^5 de	1.0×10^2 c	1.9×10^6 c	2.3×10^6 b
trb	267 (+)	4.0×10^6 b	1.1×10^7 a	9.4×10^6 a	3.0×10^5 c	2.8×10^7 b	2.6×10^7 b
prb	253 (-)	1.3×10^5 c	2.8×10^5 c	1.5×10^5 e	7.6×10^6 c	1.7×10^6 c	8.7×10^5 b
prb	268 (-)	5.8×10^6 b	1.1×10^7 a	9.4×10^7 a	9.2×10^4 c	8.6×10^6 c	4.9×10^5 b
prb	287 (+)	4.3×10^3 c	2.6×10^4 c	3.3×10^3 e	3.4×10^4 c	1.6×10^5 c	6.2×10^4 b
vrb	316 (+)	1.0×10^6 c	1.6×10^6 b	1.4×10^6 cd	1.8×10^5 c	2.2×10^6 c	1.8×10^6 b
em	346 (-)	9.2×10^6 a	1.0×10^7 a	4.7×10^6 b	3.0×10^7 b	3.0×10^7 b	3.0×10^7 b

*Sg; *S. griseoviridis*, trb; tavallinen rupibakteeri, prb; pohjanrupibakteeri, vrb; verkkorupibakteeri, em; lajia ei määritetty.

Kuvista 2 ja 3 nähdään kullekin kannalle optimaalisin pH-arvo. *S. griseoviridis* kasvoi kaikilla pH -tasolla hyvin, mutta sitä paremmin mitä korkeampi pH-arvo oli. Kannat 16IV, 316, 267 ja 53 viihtyivät hyvin pH-arvoilla 6.5 ja 8.0. Kantojen 346, 253, 287 ja 268 kasvuun pH:lla ei ollut tilastollista merkitystä.



Kuva 2. pH:n vaikutus sädebakteerikantojen kasvuun, jota kuvattu keskimääräisin pesäkelukumäärin (cfu-arvot) kokeessa 1. Cfu-arvot logaritmisia Log (x+1). Sg; *Streptomyces griseoviridis*. Kirjaimet palkkien päässä kuvaavat tilastollista eroa eri pH-arvojen välillä. Kirjain a kuvaa suurinta kasvua. Eri kannat eivät ole keskenään verrannollisia.



Kuva 3. pH:n vaikutus sädebakteerikantojen kasvuun, jota kuvattu cfu-arvojen logaritmein (Log X+1), kokeessa 2. Sg; *Streptomyces griseoviridis*. Kirjaimet palkkien päässä kuvaavat tilastollista eroa eri pH-arvojen välillä. Kirjain a kuvaa suurinta kasvua. Eri kannat eivät ole keskenään verrannollisia

Itiöiminen väheni samassa tahdissa bakteerien kasvun kanssa, joten molemmat mittarit kertoivat toisiaan tukien kasvuolojen huononemisesta. Useilla kannoilla oli vaikeuksia tuottaa itiöitä pH:ssa 5.5. Esimerkiksi kanta 161V ei tuottanut itiöitä pH:ssa 5.5 lainkaan ja kanta 53 vain kokeessa 1. Myös kannat 316 ja 253 muodostivat itiöitä

heikosti pH:ssa 5.5. Kannat 253 ja 287 tuottivat itiöitä kaikilla pH-tasoilla vähemmän ja hitaammin kuin muut kannat (Taulukko 4 ja 5).

Taulukko 5. pH:n vaikutus sädebakteerien itiöintiin.

	pH 5.5		pH 6.5		pH 8.0	
	Koe 1	Koe 2	Koe 1	Koe 2	Koe 1	Koe 2
Sg	++	++	++	++	++	++
16IV	-	-	++	++	++	++
53	++	-	++	++	++	++
267	++	++	++	++	++	++
253	+	+	++	+	++	+
268	++	+	++	++	++	++
287	++	+	++	++	++	+
316	+	+	++	++	++	++
346	++	++	++	++	++	++

++; runsaasti itiöitä, +; heikosti itiöitä, -; ei itiöitä. Sg; *Streptomyces griseoviridis*.

5.3 Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovaikutukset

5.3.1 Estovaikutus eri pH-oloissa

Kokeessa testattu sädebakteerikantojen keskinäinen estovaikutus vaihteli riippuen kasvatusalustan pH:sta. Estettävien kantojen kasvukyky tietyssä pH:ssa vaikutti estävän kannan estotehokkuuteen. Kokeissa erottui kolme estovaikutukseltaan hyvää kantaa; *S. griseoviridis*, 16IV ja 346. *S. griseoviridis*, 316 ja 346 muodostivat pH:ssa 8.0 estovyöhykkeen itsensäkin kanssa (Taulukko 6, 7 ja 8).

pH:ssa 5.5 *S. griseoviridis* esti kaikkien muiden kantojen kasvua tehokkaasti, mutta kantojen 253 ja 346 kasvua se ei pystynyt täysin estämään. Kanta 346 esti tehokkaasti muiden paitsi kannan 268 kasvun. Muiden kuin kantojen *S. griseoviridis* ja 346 aiheuttamat estovyöhykkeet jäivät pienemmiksi pH:ssa 5.5. Kannan 16IV kasvualustakiekosta, jonka pH oli n. 6.4, diffundoitui jotakin muiden kantojen

kasvua ehkäisevää aineenvaihduntatuotetta, sillä vaikka kanta 16IV kasvoi heikosti pH:ssa 5.5, se esti kaikkien muiden kantojen kasvua, paitsi itsensä.

pH:ssa 6.5 *S. griseoviridis* esti kaikkien muiden kantojen kasvua erinomaaisesti eri kantojen estovyöhykkeiden keskiarvojen ollessa välillä 4.2-18.3mm. Kanta 16IV ei aiheuttanut yhtä tasaista estovaikutusta pH:ssa 6.5 kuin pH:ssa 5.5, eli esimerkiksi kantoja 346 ja 268 vastaan ei muodostunut lainkaan estovyöhykkeitä. Kanat 346 ja 268 estivät kaikkien kantojen kasvua pH:ssa 6.5. Kuitenkin pientä tilastollista eroa kantojen välillä löytyi (Taulukko 7).

pH:ssa 8.0 *S. griseoviridis* –kannalla oli tasaisen tehokas estovaikutus kaikkia kantoja vastaan. Myös kanta 16IV oli tasainen estovaikutukseltaan, joskaan ei yhtä tehokas kuin *S. griseoviridis*. Kanta 346 esti kaikkia muita kantoja tehokkaasti, paitsi kantaa 53 (Taulukko 8).

Taulukko 6. Sädebakteerien välille muodostuva estovyöhyke pH:ssa 5.5. Kahden kokeen tulokset on yhdistetty ($n = 6$). Sarakkeissa samalla kirjaimella merkityissä testikantapareissa estovyöhykkeen laajuudessa (mm) ei ole eroa. Laajin estovyöhyke on merkitty a:lla. Tuloksia verrataan sarakkeittain. Sarakkeet eivät ole keskenään verrannollisia.

Estettävä		Estäjäkanta							
Kanta	Sg	16IV	53	267	253	268	287	316	346
Sg	0.0d	4.5ab	1.4a	1.0abc	2.2bc	3.0bcd	2.3 abc	3.4 abc	4.4bc
16IV	23.7a	0.0b	0.2b	0.2bc	5.2a	8.8a	5.7 a	4.0 ab	26.5a
53	19.5ab	2.0ab	0.0b	0.0d	4.8a	7.2ab	5.7 a	5.0 a	8.7bc
267	26.0a	5.8a	0.0b	0.0d	4.2ab	5.5abc	5.3 ab	4.8 ab	13.7b
253	9.3bcd	2.0ab	0.2b	1.3a	0.0c	1.7dc	0.6 c	0.2 c	5.0bc
268	12.5abcd	1.0ab	0.1b	1.2ab	0.0c	0.0d	0.0 c	0.0 c	3.7c
287	16.2ab	1.7ab	0.0b	1.1abc	0.0c	0.4d	0.0 c	0.0 c	4.7bc
316	13.7abcd	0.7ab	0.2b	1.0abc	0.0c	0.3d	0.0 c	0.0 c	7.3bc
346	5.5cd	0.5ab	0.6ab	0.1cd	0.9c	1.92dc	1.0 bc	1.5 bc	0.0c

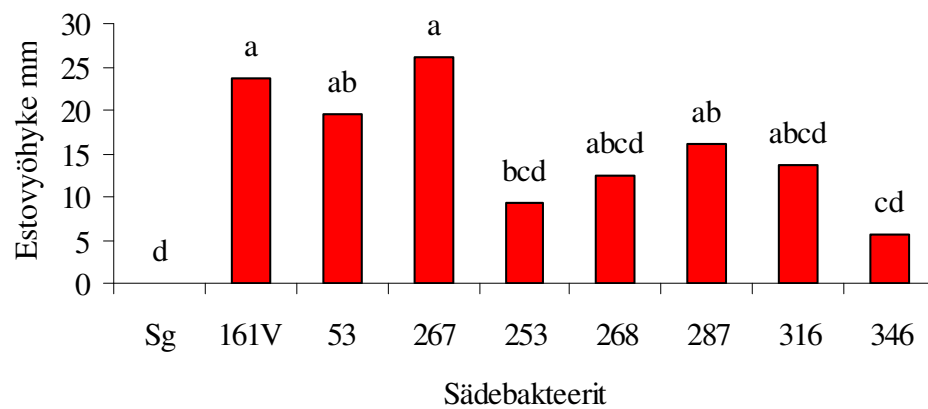
Taulukko 7. Sädebakteerien välille muodostuva estovyöhyke pH:ssa 6.5. Kahden kokeen tulokset on yhdistetty ($n = 6$). Sarakkeissa samalla kirjaimella merkityissä testikantapareissa estovyöhykkeen laajuudessa (mm) ei ole eroa. Laajin estovyöhyke on merkitty a:lla. Tuloksia verrataan sarakkeittain. Sarakkeet eivät ole keskenään verrannollisia.

Estettävä		Estäjäkanta							
Kanta	Sg	161V	53	267	253	268	287	316	346
Sg	0.0cd	0.7ab	2.7a	1.0ab	2.2bc	2.5abc	0.2c	2.6ab	8.0ab
161V	4.5cd	0.0b	0.2b	0.5abc	3.7a	3.5a	3.2a	3.2a	12.5a
53	13.8ab	0.9ab	0.0b	0.0c	2.3ab	3.0ab	1.7bc	2.5ab	6.5bc
267	18.3a	0.9ab	0.0b	0.0c	2.5a	3.2ab	2.5ab	2.2ab	9.3ab
253	8.5bc	0.8ab	0.2b	1.0ab	0.0c	1.7bcd	0.0d	0.3cd	3.5bcd
268	15.1ab	0.0b	0.0b	1.4a	0.0c	0.0e	0.0d	0.2cd	3.1bcd
287	12.2ab	1.6a	0.0b	0.8abc	0.0c	0.5de	0.0d	0.1cd	3.3cd
316	12.7ab	1.1ab	0.2b	1.4a	0.0c	1.3cde	0.0d	0.0d	8.0ab
346	4.2cd	0.0b	0.5b	0.3bc	0.9bc	2.4abc	1.5c	1.3bc	0.0d

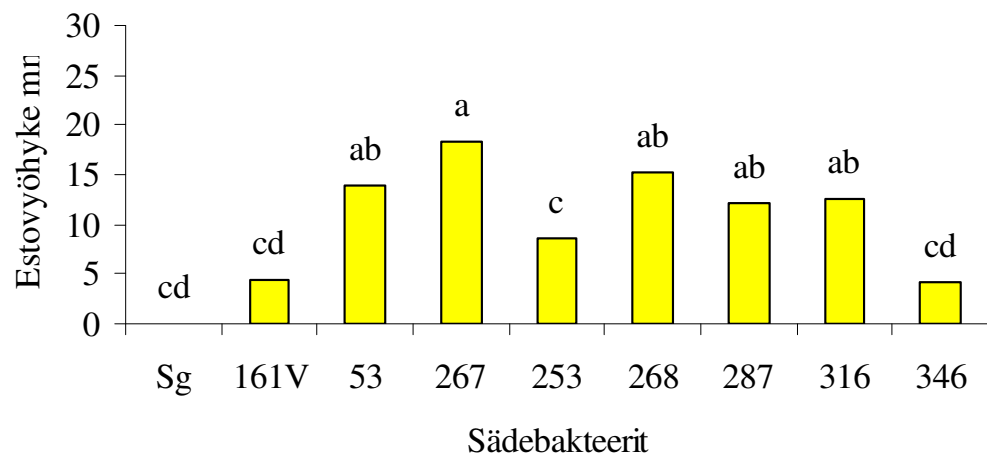
Taulukko 8. Sädebakteerien välille muodostuva estovyöhyke pH:ssa 8.0. Kahden kokeen tulokset on yhdistetty ($n = 6$). Sarakkeissa samalla kirjaimella merkityissä testikantapareissa estovyöhykkeen laajuudessa (mm) ei ole eroa. Laajin estovyöhyke on merkitty a:lla. Tuloksia verrataan sarakkeittain. Sarakkeet eivät ole keskenään verrannollisia.

Estettävä		Estäjäkanta							
Kanta	Sg	161V	53	267	253	268	287	316	346
Sg	0.7c	0.7a	5.5a	1.3a	2.0b	1.9abc	0.7bc	2.2ab	3.7b
161V	8.5b	0.0a	0.8b	0.7ab	3.8a	3.3a	4.5a	3.6a	5.6ab
53	14.2a	1.5a	0.0b	0.0b	2.2b	2.6ab	1.6b	2.0ab	0.7cd
267	13.7a	0.6a	0.0b	0.0b	1.9b	2.1abc	1.6b	2.4ab	3.9ab
253	13.7a	1.3a	0.3b	1.1a	0.0d	1.9abc	0.0c	0.8b	2.1bcd
268	14.0a	0.6a	0.5b	1.2a	0.0d	0.0d	0.0c	1.1b	2.2bcd
287	14.7a	0.8a	0.0b	0.9a	0.0d	0.7cd	0.0c	0.4b	2.7bcd
316	13.6a	0.9a	0.1b	1.2a	0.4cd	2.0abc	0.2c	0.4b	3.0b
346	6.7b	1.1a	1.2b	0.9a	1.4bc	1.4bcd	1.7b	1.9ab	0.2d

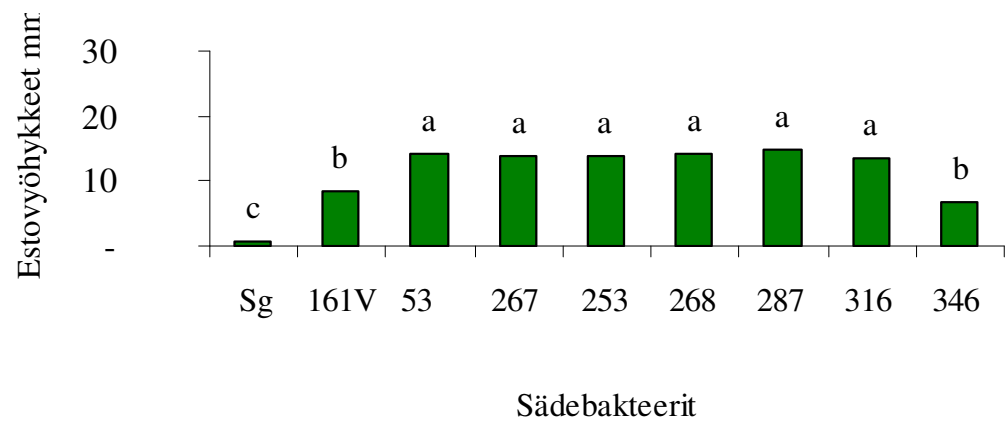
pH 5.5



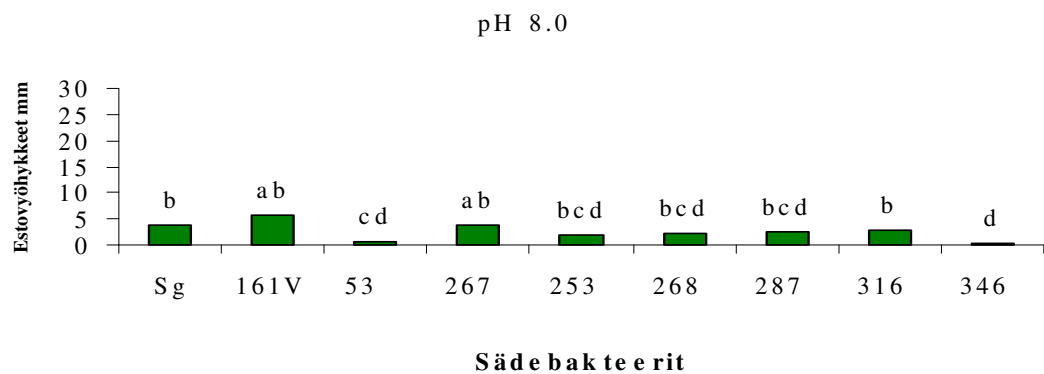
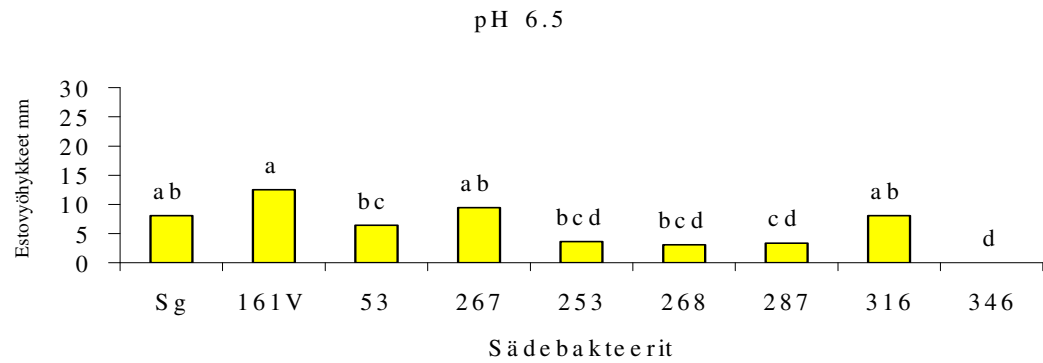
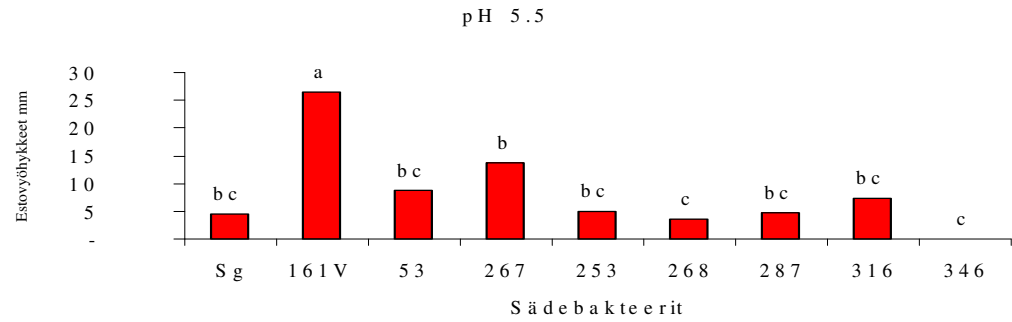
pH 6.5



pH 8.0



Kuva 4. *S. griseoviridis* -bakteerin aiheuttamat estovyöhykkeet kolmessa pH:ssa. Eri kirjaimella merkityt eroavat tilastollisesti a:n merkityksessä suurinta estovyöhykettä. Sg: *S. griseoviridis*.



Kuva 5. Sädebakteerikannan 346 aiheuttamat estovyohtykykkeit kolmessa pH:ssa. Eri kirjaimella merkityt eroavat tilastollisesti a:n merkitessä suurinta estovyohtykykettä. Sg: *S. griseoviridis*.

S. griseoviridis ja 346 aiheuttivat suurimmat estovyöhykkeet pääsääntöisesti silloin, kun estettävä kanta kasvoi pH:ssa 5.5. *S. griseoviridis* -bakteerin aiheuttamien estovyöhykkeiden koossa ei ollut suuria eroja pH:ssa 6.6 ja 8.0, kun taas 346 aiheutti pienimmät estovyöhykkeet pH:ssa 8.0 (kuva 4 ja 5). Sädebakteerikannan 16IV aiheuttamat estovyöhykkeet ovat pH:ssa 6.5 ja 8.0 pieniä verrattuna *S. griseoviridis* -bakteerin aiheuttamiin (Taulukko 6-8).

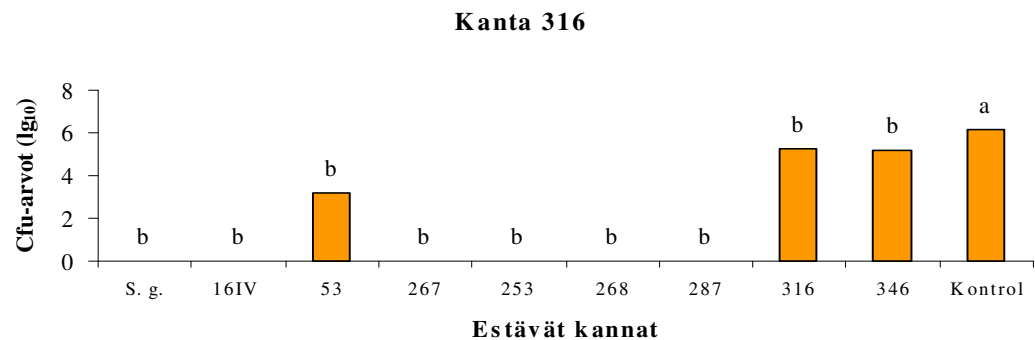
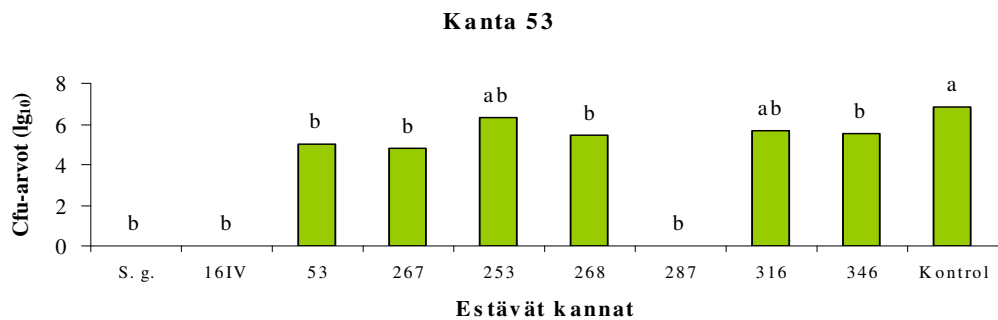
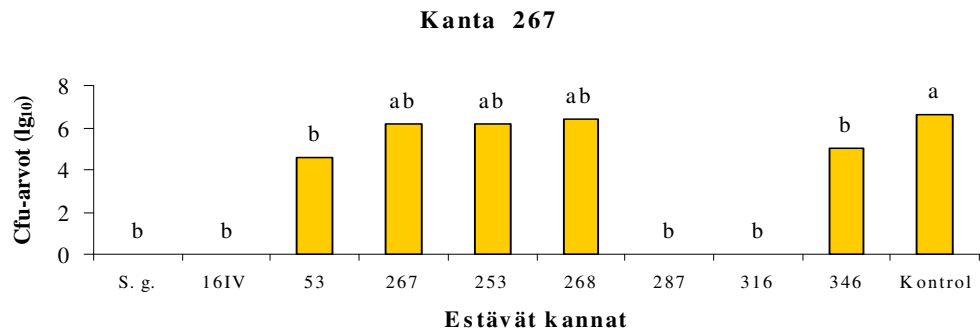
5.3.2 Kasvualustaan imeytyvät estoaineet

Sellofaanikalvon pinnalla kasvatettujen bakteereiden oletettiin tuottavan estoaineita joiden puolestaan oletettiin imeytyvän kasvualustaan sellofaanikalvon läpi. Estävä bakteerikanta levitettiin kasvamaan kasvualustan pinnalle asetetun sellofaanikalvon päälle. Estävä kanta pystyi käyttämään ravintoalustan ravinteita, mutta se ei kasvanut kalvon läpi. Estettävä kanta asetettiin kasvamaan ravintoalustalle sellofaanikalvon poiston jälkeen.

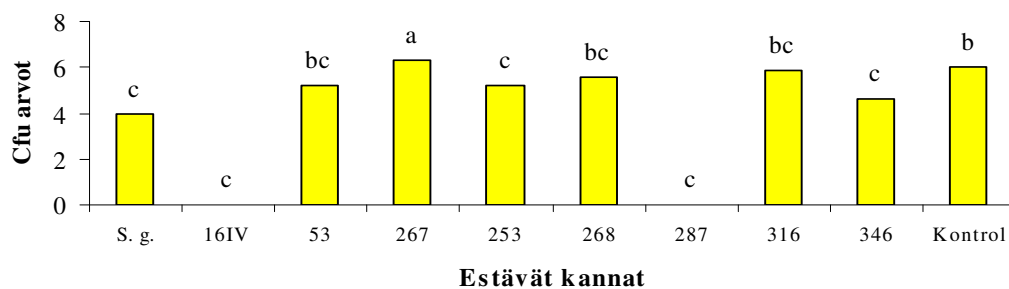
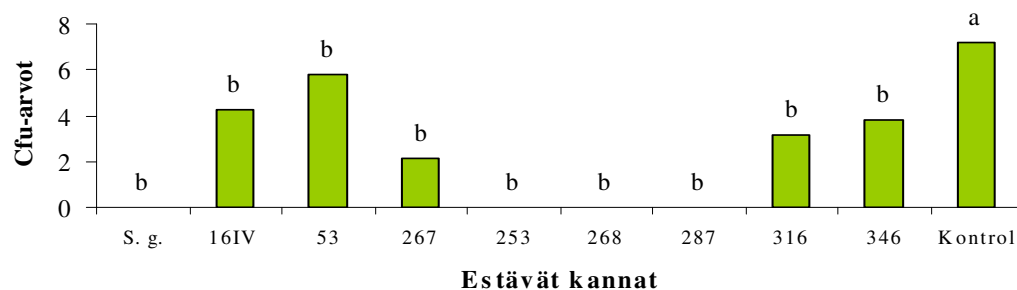
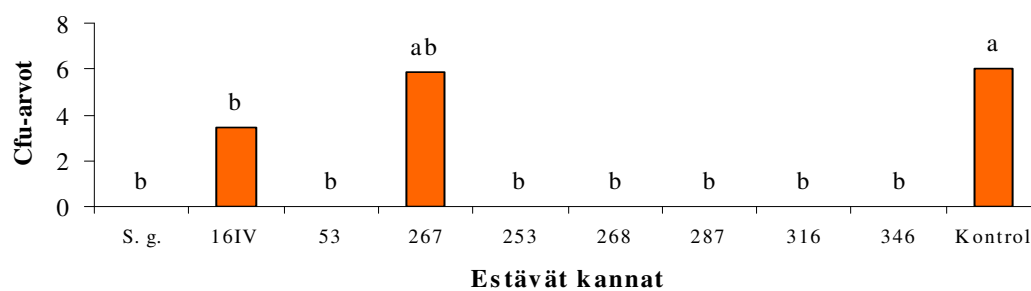
Bakteerisaastunnat häiritsivät koetta. Osasta testipareista ei saatu tulosta molemmista kokeista, tai kaikista kokeen kolmesta kerranteesta ei saatu tulosta. Tästä johtuen havaintojen lukumäärä (n) oli yhden ja kuuden välillä, suurimmassa osasta kokeita kuitenkin kuusi. Tilastollisia arvoja tarkasteltiin varianssianalyysillä, ja parivertailut tehtiin Tukey-Kramerin menetelmällä. Merkitsevyystasona käytettiin arvoa 0.05 (KORHONEN 1995). Tilastollisesti löytyi merkittäviä eroja eri kantojen esto-vaikutuksista (Taulukko 9.).

Taulukko 9. Sellofaanikalvolla kasvaneen estävän kannan tuottamien, kasvualustaan imeytyneiden yhdisteiden vaikutukset estettävän kannan kasvuun (cfu-arvoihin) ko-
keessa kasvualustaan imeytyvät estoaaineet. Samalla kirjaimella merkityt cfu-arvot
eivät eroa toisistaan. Heikointa estovaikutusta ja samalla suurinta kasvua on merkitty
a -kirjaimella. Tuloksia verrataan riveittäin. Ne ovat keskiarvoja kahden kokeen tu-
loksista ($n = 1-6$). Eräistä testipareista ei saatu tulosta molemmista kokeista.

Estettävä		Estävä kanta								
Kanta	<i>S. griseoviridis</i>	16IV	53	267	253	268	287	316	346	Kontrolli
<i>S. griseoviridis</i>	8.7×10^3 c	0c	1.7×10^5 bc	2.2×10^4 a	1.5×10^5 c	3.5×10^5 bc	0c	7.3×10^5 bc	4.1×10^4 c	1.1×10^6 b
16IV	0b	1.7×10^4 b	6.0×10^5 b	145b	0b	0b	0b	1340b	6883b	1.6×10^7 a
53	0b	0b	1.0×10^6 b	6.2×10^4 b	2.2×10^6 ab	2.8×10^5 b	0b	4.6×10^5 b	3.4×10^5 b	7.4×10^6 a
267	0b	0b	3.6×10^4 b	1.5×10^6 ab	1.5×10^6 ab	2.4×10^6 ab	0b	0b	1.0×10^5 b	4.2×10^6 a
253	0b	2667b	0b	8.0×10^5 ab	0b	0b	0b	0b	0b	1.1×10^6 a
268	0b	0b	0b	0b	0b	1.4×10^5 ab	0b	1.3×10^5 ab	1133b	5.1×10^5 a
287	0b	0b	118ab	0b	0b	0b	6.8×10^4 ab	1.8×10^6 a	0b	2.0×10^5 ab
316	0b	0b	1611b	0b	0b	0b	0b	1.7×10^5 b	1.6×10^5 b	1.5×10^6 a
346	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	0b	2.0×10^7 a



Kuva 6. Patogeenisten sädebakteerikantojen 267, 53 ja 316 kasvu alustalla, johon oli imeytynyt samalla alustalla aiemmin sellofaanikalvon päällä kasvaneen kannan yhdisteitä. Estovaikutus on parhaimmillaan silloin, kun sädebakteeri ei kasva lainkaan. Kasvua kuvaavat cfu-arvoista lasketut kymmenkantaiset logaritmiarvot. Kirjaimet palkkien päissä kuvaavat tilastollista eroavaisuutta kokeen sisällä. Eri kirjaimella merkityt cfu-arvot eroavat toisistaan. Kuvat on piirretty Taulukon 9 tuloksista.

S. griseoviridis**Kanta 16IV****Kanta 253**

Kuva 7. Rupea aiheuttamattomien sädebakteerikantojen *Streptomyces griseoviridis*, 16IV ja 253 kasvu alustalla, johon oli imeytynyt samalla alustalla aiemmin sellonfaanikalvon päällä kasvaneen kannan yhdisteitä. Kasvua kuvaavat cfu-arvoista lasketut kymmenkantaiset logaritmiarvot. Kirjaimet palkkien päissä kuvaavat tilastollista eroavaisuutta ja eri kirjaimella merkityt eroavat toisistaan. Paras kasvu on merkitty a-kirjaimella. Kuvat on piirretty Taulukon 9 tuloksista.

Kokeessa ”Kasvualustaan imeytyvät estoaineet” kontrollina käytettiin puhdasta sellofaanikalvomaljaa, jolta sellofaanikalvo poistettiin ja sädebakteerikanta levitettiin kasvamaan kasvualustalle. Kaikkien kantojen kontrollit kasvoivat hyvin ja tilastollisesti merkittäviä eroja syntyi kontrollin ja estävien kantojen välille kaikissa testipareissa (Taulukko 9.)

Parhaimmat estovaikutukset saivat aikaan kannat *S. griseoviridis*, 16IV, ja 287. *S. griseoviridis* ja kanta 287 estivät kaikkien muiden kantojen, paitsi itsensä, kasvun. Kanta 16IV taas esti kaikkien muiden kantojen paitsi kannan 253 ja itsensä kasvun (Taulukko 9).

Ryhmään 1a, kuuluvat kannat 53 ja 267 eivät estäneet toistensa kasvua. Ryhmän 4a kannat eivät käyttäytyneet kuten ryhmään 1a kuuluvat kannat, sillä ne estivät osittain myös samaan ryhmään kuuluvien kantojen kasvua. Ryhmän 4a kannat ovat *S. turgidiscabies* -lajia ja siihen kuuluvat kannat 253, 268 ja 287 (Taulukko 9).

Patogeenisten *S. scabies* -kantojen 53 ja 267 kasvua estivät kannat *S. griseoviridis*, 16IV ja 287. Kasvua heikensi tilastollisesti merkittävästi myös rupea aiheuttamaton kanta 346. Verkkorupikanta 316:n (*S. aureofaciens*) kasvun estivät kannat *S. griseoviridis*, 16IV, 267, 253, 268 ja 287 (Kuva 6).

Parhaiten muiden kantojen estovaikutusta sietä kanta *S. griseoviridis*. Sen kasvun estivät täysin vain kannat 16IV ja 287. *S. griseoviridis* -kannan kilpailukyky muiden sädebakteerikantojen kanssa oli erinomainen. Kannan 253 kasvu estyi muiden paitsi kantojen 16IV ja 267 vaikutuksesta, joten sen kilpailukykyominaisuudet eivät vaikuta yhtä hyviltä kuin *S. griseoviridis* -kannan. Kannan 16IV kasvun estivät *S. griseoviridis* ja kannat 253, 286 ja 287. Rupea aiheuttavat kannat 53 ja 316 eivät estäneet kannan 16IV kasvua täysin (Kuva 7).

5.3.3 Seoskasvatus

Kokeessa kasvatettiin samalla alustalla melaniinia tuottamatonta ja tuottavaa kantaa. Kahden eri kannan pesäkkeet erotettiin toisistaan melaniinin aiheuttaman tumman renkaan perusteella. Melaniinia tuottavia ovat kannat 346, 53, 267 ja *S. griseoviridis*. Kontrollina käytettiin kantaa, joka oli kasvanut kasvatusalustalla yksinään. Kontrolliin vertaamalla voidaan arvioida, miten kaksi kantaa on vaikuttanut toistensa kas-

vuun. Yhdistelmissä, joissa oli mukana kanta 287, ei saatu tuloksia kokeessa 1, koska kontrolli ei kasvanut.

Taulukko 10. Seoskasvatuskoe 1. Taulukossa ovat pystyriivillä melaniinia tuottamattomat kannat ja vaakariivillä melaniinia tuottavat kannat. Kussakin laatikossa, joka on jaettu kahteen osaan, on melaniinia tuottamattoman sekä melaniinia tuottavan kannan cfu-arvojen keskiarvot kolmesta kerranteesta ($n = 3$). Laatikon päällimmäisessä osassa on melaniinia tuottavien ja alemmassa osassa melaniinia tuottamattomien kantojen arvot, kun ne ovat kasvaneet yhdessä samalla kasvatusmaljalla. Kirjaimet lukujen perässä kertovat tilastollisista eroista. Kirjain a tarkoittaa suurinta kasvua. Eri kirjaimella merkityt arvot eroavat toisistaan eli jos toinen kanta on merkitty ab ja toinen bc, kannat eivät eroa toisistaan, koska molemmista kirjainyhdistelmistä löytyy kirjain b.

	S. g.	346	53	267	kontrolli*
161V	3.5x10 ⁶ cde 1.3x10 ⁷ a	3.7x10 ⁶ cde 5.3x10 ⁶ cde	0e 1.2x10 ⁷ ab	0e 1.4x10 ⁷ a	1.3x10 ⁷ a
253	3.8x10 ⁶ cde 2.3x10 ⁶ de	8.8x10 ⁶ abc 1.2x10 ⁶ de	X X	0e 5.1x10 ⁶ cde	4.3x10 ⁶ cde
268	6.6x10 ⁶ bcd 1.5x10 ⁶ de	4.1x10 ⁶ cde 1.7x10 ⁵ e	2.0x10 ⁴ e 8.0x10 ⁴ e	1.7x10 ⁵ e 1.4x10 ⁵ e	1.2x10 ⁵ e
316	2.4x10 ⁶ de 1.0x10 ⁶ de	5.1x10 ⁶ cde 5.3x10 ⁵ e	2.5x10 ⁵ e 1.1x10 ⁶ de	0e 0e	2.1x10 ⁶ de
kontrolli**	3.7x10 ⁶ cde	4.6x10 ⁶ cde	5.4x10 ⁴ e	2.3x10 ⁵ e	

S.g.; *Streptomyces griseoviridis*, Kontrolli*; melaniinia tuottamattomien kontrollit
Kontrolli**; melaniinia tuottavien kontrollit, X; ei tulosta

Taulukko 11. Seoskasvatuskoe 2. Taulukossa on pystyriivillä melaniinia tuottamattomat kannat ja vaakariivillä melaniinia tuottavat kannat. Kussakin laatikossa, joka on jaettu kahteen osaan, on melaniinia tuottamattoman sekä melaniinia tuottavan kannan cfu-arvojen keskiarvot kolmesta kerranteesta ($n = 3$). Laatikon päällimmäisessä osassa on melaniinia tuottavien ja alemmassa osassa melaniinia tuottamattomien kantojen arvot, kun ne ovat kasvaneet yhdessä samalla kasvatusmaljalla. Kirjaimet lukujen perässä kertovat tilastollisista eroista. Kirjain a tarkoittaa suurinta kasvua. Eri kirjaimella merkityt arvot eroavat toisistaan eli jos toinen kanta on merkitty ab ja toinen bc, kannat eivät eroa toisistaan, koska molemmista kirjainyhdistelmistä löytyy kirjain b.

	S. g.	346	53	267	kontrolli*
161V	5.6x10 ⁶ cde 1.5x10 ⁷ b	6.7x10 ⁶ cde 9.0x10 ⁶ bc	X X	0e 3.8x10 ⁷ a	 3.2x10 ⁷ a
253	4.9x10 ⁶ cde 5.2x10 ⁶ cde	9.1x10 ⁶ bc 1.3x10 ⁶ de	0e 2.6x10 ⁶ cde	0e 3.3x10 ⁶ cde	 3.1x10 ⁶ cde
268	3.6x10 ⁶ cde 2.0x10 ⁵ e	6.7x10 ⁶ cde 1.0x10 ⁶ e	0e 2.4x10 ⁶ cde	0e 2.4x10 ⁶ cde	 2.1x10 ⁶ cde
287	5.7x10 ⁶ cde 1.7x10 ⁵ e	5.4x10 ⁶ cde 5.3x10 ⁵ e	0e 1.1x10 ⁶ de	2.0x10 ⁴ e 0e	 6.3x10 ⁵ e
316	7.5x10 ⁶ bcde 3.0x10 ⁵ e	6.8x10 ⁶ cde 5.0x10 ⁵ e	2.7x10 ⁴ e 7.7x10 ⁴ e	2.2x10 ⁴ e 2.5x10 ⁴ e	 1.0x10 ⁴ e
kontrolli**	5.5x10 ⁶ cde	8.6x10 ⁶ bcd	3.5x10 ⁶ e	2.3x10 ⁴ e	

S.g.; *Streptomyces griseoviridis*, Kontrolli*; melaniinia tuottamattomien kontrollit
kontrolli**; melaniinia tuottavien kontrollit, X; ei tulosta

Taulukoista 10 ja 11 nähdään, että *S. griseoviridis* ei estänyt muiden kantojen kasvua eikä yksikään kanta heikentänyt sen kasvua merkittävästi. *S. griseoviridis* kuitenkin heikensi kannan 16IV kasvua kokeessa 2 (Kuvat 8 ja 10).

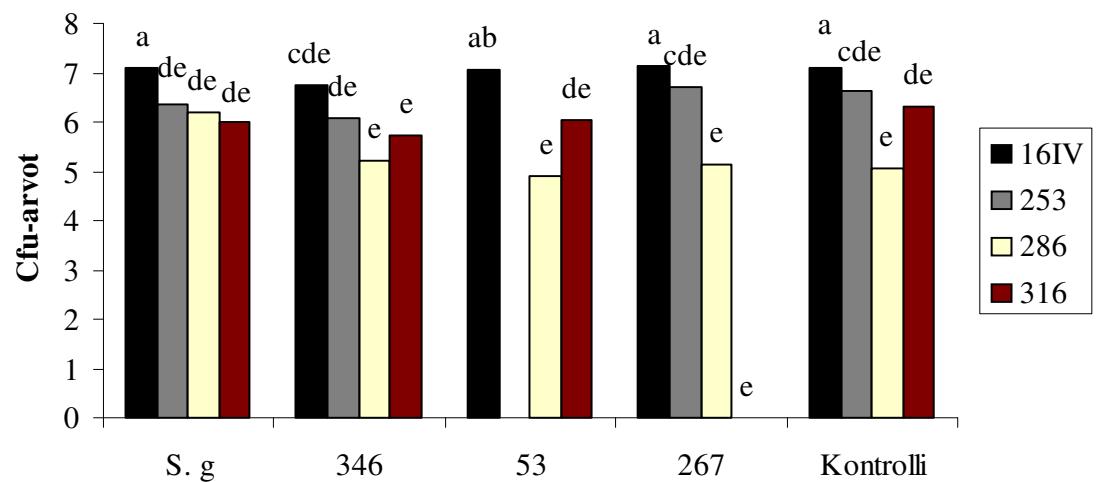
Kanta 16IV esti patogeenisten kantojen 53 ja 267 kasvun (Kuva 9 ja 11), ja kannan 16IV kasvua heikensi merkittävästi vain kanta 346 (Taulukko 10 ja 11).

Kanta 253 esti kantojen 267 ja 53 kasvun ja jopa lisäsi kannan 346 kasvua. Kannan 253 kasvua ei taas estänyt mikään kanta (Taulukot 10 ja 11, kuvat 9 ja 11).

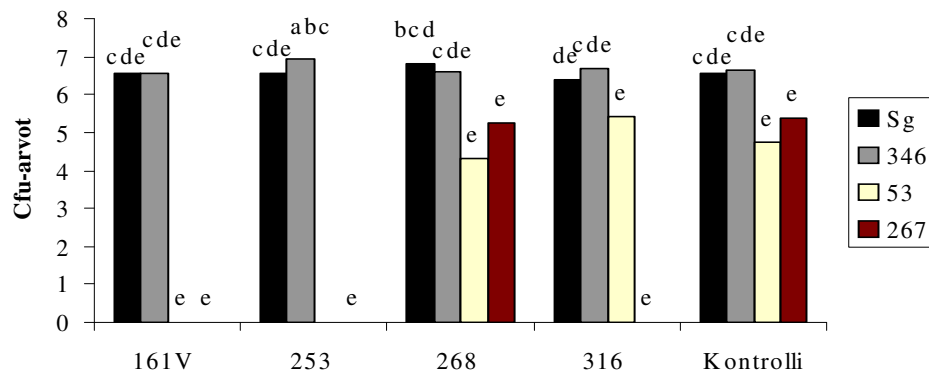
Kannan 53 kanssa oli ongelmia ja tulokset jäivät sen osilta vajavaisiksi eikä molemmista kokeista ei saatu yhteneviä tuloksia. Kokeessa yksi kannan 53 kasvun esti kanta 16IV ja kokeessa kaksi kannat 253, 268 ja 287. Kanta 53 ei vähentänyt merkittävästi muiden kantojen kasvua (Taulukot 10 ja 11).

Kanta 287 esti kannan 53 kasvun ja kanta 267 esti kannan 287 kasvun. Kokeen 2 osalta tulokset jäivät saamatta (Taulukot 10 ja 11).

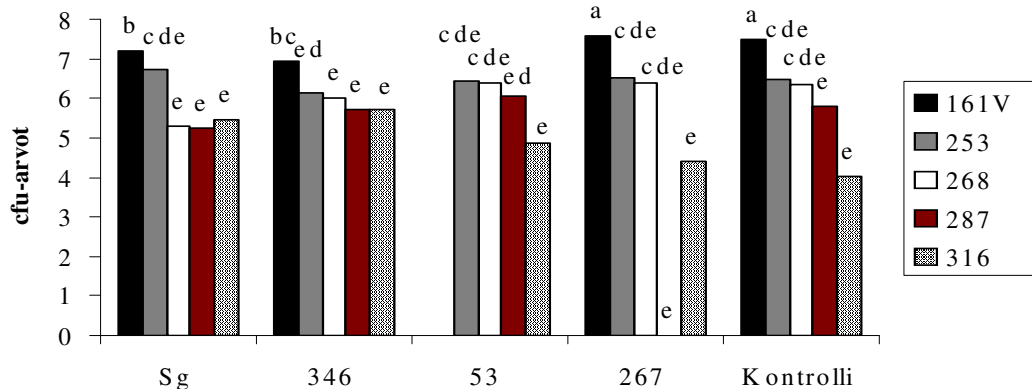
Kannat 316 ja 267 estivät toistensa kasvun kokeessa 1, mutta yhteneviä tuloksia ei saatu kokeesta 2 (Taulukot 10 ja 11).



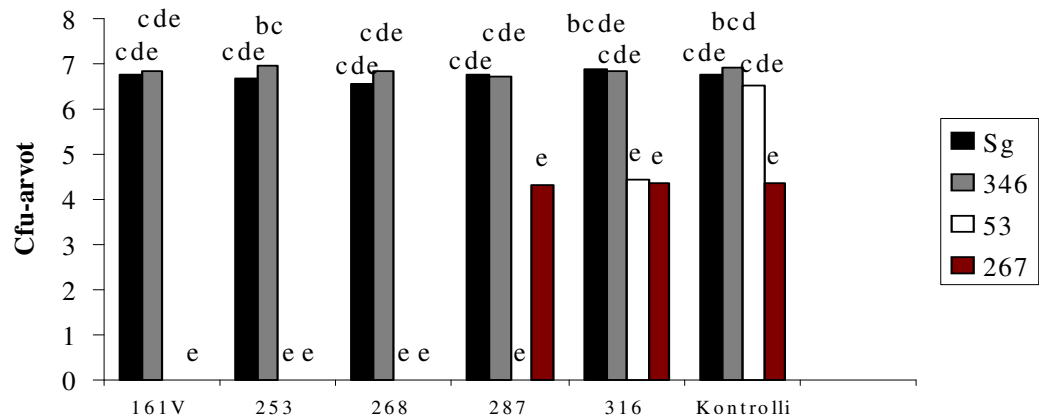
Kuva 8. Seoskasvatuskokeen 1. melaniinia tuottamattomien kantojen kasvu cfu-arvoina (\log_{10} , $n = 1-6$). Kannat on kasvatettu melaniinia tuottavien kantojen kanssa, jotka on esitetty kaaviossa vaakarivillä. Kontrolli on kasvatettu ravintoalustalla yksinään. Kuvasta voidaan vertailla, miten toisen kannan läsnäolo on vaikuttanut kannan kasvuun verrattuna kontrolliin. Tilastollisia eroavaisuuksia on merkitty kirjaimilla palkkien päissä. Eri kirjaimilla merkityt arvot eroavat toisistaan merkitsevästi ($p < 0.001$ merkitsevyystasolla 5 %). Kirjain a merkitsee parasta kasvua.



Kuva 9. Seoskasvatuskokeen 1. melaniinia tuottavien kantojen kasvu cfu-arvoina (\log_{10} , $n = 1-6$). Kannat on kasvatettu melaniinia tuottamattomien kantojen kanssa, jotka on esitetty kaaviossa vaakarivillä. Kontrolli on kasvatettu ravintoalustalla yksinään. Kuvasta voidaan vertailla, miten toisen kannan läsnäolo on vaikuttanut kannan kasvuun verrattuna kontrolliin. Tilastollisia eroavaisuuksia on merkitty kirjaimilla palkkien päissä. Eri kirjaimilla merkityt arvot eroavat toisistaan merkitsevästi ($p < 0.001$ merkitsevyystasolla 5 %). Kirjain a merkitsee parasta kasvua.



Kuva 10. Seoskasvatuskokeen 2. melaniinia tuottamattomien kantojen kasvu cfu-arvoina (\log_{10} , $n = 1-6$). Kannat on kasvatettu melaniinia tuottavien kantojen kanssa, jotka on esitetty kaaviossa vaakarivillä. Kontrolli on kasvatettu ravintoalustalla yksinään. Kuvasta voidaan vertailla, miten toisen kannan läsnäolo on vaikuttanut kannan kasvuun verrattuna kontrolliin. Tilastollisia eroavaisuuksia on merkitty kirjaimilla palkkien päissä. Eri kirjaimilla merkityt arvot eroavat toisistaan merkitsevästi ($p < 0.001$ merkitsevyystasolla 5 %). Kirjain a merkitsee parasta kasvua.



Kuva 11. Seoskasvatuskokeen 2. melaniinia tuottavien kantojen kasvu cfu-arvoina (\log_{10} , $n = 1-6$). Kannat on kasvatettu melaniinia tuottamattomien kantojen kanssa, jotka on esitetty kaaviossa vaakarivillä. Kontrolli on kasvatettu ravintoalustalla yksinään. Kuvasta voidaan vertailla, miten toisen kannan läsnäolo on vaikuttanut kannan kasvuun verrattuna kontrolliin. Tilastollisia eroavaisuuksia on merkitty kirjaimilla palkkien päissä. Eri kirjaimilla merkityt arvot eroavat toisistaan merkitsevästi ($p < 0.001$ merkitsevyystasolla 5 %). Kirjain a merkitsee parasta kasvua.

Taulukko 12. Taulukossa esitetty kannat, joiden kasvu estyi seoskasvatuskokeissa. Vasemmalla pystyrivissä on esitetty kannat, joiden vaikutuksesta toisen kannan kasvu estyi, ja oikealla kahdessa rivissä listattu ne kannat, joiden kasvu estyi.

Estävä kanta	Koe 1	Koe 2
16IV	53, 267	267 (53 ei tulosta)
253	267, (53 ei tulosta)	267, 53
268	-	53, 267
287	ei tuloksia	53
316	267	-
267	316 (287 ei tulosta)	287

Taulukossa 12 on pyritty selventämään seoskasvatuskokeiden tuloksia. Taulukon perusteella kannat 16IV ja 253 olivat lupaavimpia biologiseen torjuntaan.

5.4 Juurenasutuskyky

Kannat asuttivat perunan juuret sekä juurihiekan. Ritsosfääri on asutettu, jos joko juuresta tai juurihieasta löytyy bakteereita. Kaikki testatut kannat asuttivat perunan juuren erinomaisesti. Kanta 268 osoittautui tällä menetelmällä testattaessa testatuista tehokkaimmaksi juuren asuttajaksi (Taulukko 13). Tulokset ovat todellisuutta parempia, sillä varsinkin kantojen 253 ja 268 erottaminen toisistaan oli hankalaa. Positiivisiksi tuloksiksi on voitu laskea joku luonnostaan hiekassa kasvanut sädebakteeri, joka muistuttaa tutkittua kantaa. Kokeen tulosten perusteella ei voida luotettavasti arvioida sädebakteerien juurenasutuskykyä.

Taulukko 13. Sädebakteerien juurenasutuskyky juuressa ja juurihieassa.

	ka ^a	kh ^b	Juuri ^c	Juurihieka ^d	Ritsosfääri ^c	Saastuke ^f
Sg ^g						
Koe 1	1.1	2.0	7	9	9	6.0
Koe 2	1.3	1.9	7	9	9	X
Koe 3	1.1	0.3	7	8	8	10.0
Koe 4	200.0	254.3	10	10	10	350.0
Koe 5	2.5	4.9	10	10	10	24.5
346						
Koe 1	5.9	9.7	10	10	10	520.0
Koe 2	100.0	76.2	7	9	9	X
Koe 3	2.1	5.0	8	10	10	320.0
253						
Koe 4	42.6	56.0	9	10	10	6.3
Koe 6	171.5	170.4	7	8	8	91.0
Koe 7	19.0	9.2	8	10	10	0.2
268						
Koe 5	1.9	1.3	10	9	10	208.5
Koe 6	298.3	173.9	10	10	10	1000.0
Koe 7	202.5	185.0	10	10	10	100.0

X; ei tulosta

a; keskiarvo juurihiekan cfu-arvoista ($\times 10^4$). n = 10.

b; keskihajonta juurihiekan cfu-arvoista. Luvut 10 000: s osina

c; mukuloiden lukumäärä, jonka juuristoon kanta oli asettunut (n = 10).

d; Niiden koejäsenten lukumäärä, joiden juurihieasta löytyi sädebakteeria

e; niiden koejäsenten lukumäärä, joiden juuresta tai juurihieasta löytyi sädebakteeria

f; saastukkeen pesäkelukumäärä/ ml, cfu/ml ($\times 10^4$)

g; *Streptomyces griseoviridis*

6 TULOSTEN TARKASTELU

Sädebakteerien kasvatuslämpötila oli kokeissa alhaisempi verrattuna esim. AGBESSI:n ym. (2003) käyttämään lämpötilaan. He kasvattivat sädebakteereita +30 °C asteessa ja LINDHOLM ym. (1997) käyttivät kokeissaan kasvatuslämpötilaa +28 °C astetta. Tämän työn kokeissa kasvatuslämpötila oli 18 °C astetta. Alhaisemmassa lämpötilassa sädebakteerien kasvu ja itiöiden tuotanto on saattanut olla hitaampaa, kuin mitä se korkeammassa lämpötilassa olisi ollut. Kokeiden kasvatusaika oli kuitenkin pidempi kuin kirjallisuudessa esiintyvät ajat. Esimerkiksi ECKWALL & SCHOTTEL (1997) kasvattivat *S. diastatochromogenes* -bakteereita +30 °C asteessa viikon. Tässä työssä kasvatusaika oli kaksi viikkoa, mikä kompensoi alhaisempaa kasvatuslämpötilaa.

Lämpötila saattaa vaikuttaa kaikkien kokeiden tuloksiin, sillä alhaisen lämpötilan epäillään edistävän estoaineiden tuotantoa tai matalalla lämpötilalla uskotaan olevan vähemmän vaikutusta antagonistin estoaineiden tuottoon, kuin antagonistin kasvunopeuteen. Myös taudinaiheuttajat saattavat olla alhaisessa lämpötilassa herkempiä estoaineiden vaikutuksille (TRONSMO & DENNIS 1978). Optimaalisin kasvatuslämpötila *S. scabies* -bakteerille on +30 °C astetta ja verkkoruvien taudinaiheuttajalle hieman alhaisempi (LORIA ym. 1997).

6.1 Sädebakteerien kyky estää sienien kasvua

Streptomyces-lajit tuottavat monenlaisia sekundäärisiä aineenvaihduntatuotteita, kuten antibiootteja sekä sienten soluseiniä hajottavia entsyymeitä. Siksi *Streptomyces*-bakteereita tutkitaan mahdollisina antagonisteina useita sienten aiheuttamia juuritauteja vastaan. Esimerkiksi *Streptomyces lydicus* estää *Pythium ultimum* ja *Rhizoctonia solani* -sienten kasvua. Elektromikroskooppikuvat osoittavat, että *S. lydicus* pystyy tuhoamaan *P. ultimum* -sienen munaitiöitä ja vahingoittamaan sen kasvurihmoja (YUAN & CRAWFORD 1995). *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* tuottaa geldamysiini-nimistä antibioottia, joka estää *R. solani* -sienen kasvua (ROTHROCK & GOTTLIEB 1984).

Testatut sädebakteerit osoittautuivat varsin tehokkaiksi antagonisteiksi *R. solani* ja *H. solani* -sieniä vastaan. Kannat 161V ja 346 estivät molempien sienten

kasvua yhtä tehokkaasti kuin *S. griseoviridis*. Kaikki kolme edellä mainittua kantaa soveltuisivat jatkotutkimuksiin, jossa etsitään perunan sienitaudinaiheuttajille biologista torjuntakeinoja. Perunantuotannossa tarvitaan pitkällä aikavälillä lisää tutkimustietoa ekologisesti ja biologisesti kestävästä tuotantomenetelmästä. Terve siemenperuna on avain perunaseitin leviämisen estämiseen ja peittäminen estää siemenlevittäisen seitin (BERG 2007). Ehkäpä tulevaisuudessa kasvitauteja torjuttaessa perunoihin voisi peitata ekologisesti kestävämmillä sädebakteereilla.

6.2 pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun

Kannat 53 ja 267 edustavat tavallisia rupibakteereita (*S. scabies*). Kummatkin kannat kasvoivat parhaiten pH:ssa 6.5, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkittävä verrattuna kasvuun pH:ssa 8.0. pH:ssa 5.5 kummatkin kannat kasvoivat heikommin kuin muilla pH-tasoilla, vaikka LORIA:n ym. (1997) mukaan *S. scabies* viihtyy pH:n ollessa välillä 5.2–7.0. Myös LABRUYÉREN (1971) mukaan tavallista perunarupea aiheuttavien *Streptomyces* -kantojen pitäisi kasvaa parhaiten pH 5.3–7.4 välillä.

Pohjanrupibakteeria (*S. turgisdiscabies*) edustavat kannat 253, 268, ja 287 kasvoivat pääsääntöisesti parhaiten pH:ssa 6.5. Tämä laji kasvaa hieman happammissa oloissa kuin tavallinen rupibakteeri (VALKONEN 2000). Siksi olikin yllättävää, että happamiin oloihin sopeutuneet pohjanrupibakteerikannat kasvoivat erittäin hyvin myös pH:ssa 8.0.

Kanta 316, joka edustaa lajia *S. aureofaciens* (verkkoruven aiheuttaja), kasvoi lähes yhtä hyvin kaikissa kolmessa pH:ssa, paitsi kokeessa 2 se kasvoi heikommin pH:ssa 5.5. LABRUYÉREN (1971) mukaan verkkoruvelle optimaalisin kasvualustan happamuus vaihtelee välillä pH 6.5 – 7.0.

Tiedetään, että mikroskopoimalla saadaan suurempia maaperäbakteerilukuja, kuin laskettaessa cfu-arvoja kasvatusalustoilta (BAKKEN & OLSEN 1987, OLSEN & BAKKEN 1987). BAKKENin ja OLSENin vertailuissa bakteerit, jotka kasvoivat heikosti ravintoköyhällä kasvatusalustoilla, olivat yleensä hyvin pieniä ja havaitut pesäkelukumäärät (CFU) olivat 20 % pienemmät kuin mikroskooppisilla menetelmillä havaitut. Tästä syystä heikosti maljoilla kasvaneiden kantojen pesäkelukumäärät saattavat olla suhteessa liian pieniä verrattuna hyvin kasvaviin kantoihin, kuten *S. griseoviridis* -kantaan.

6.3 Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovaikutukset

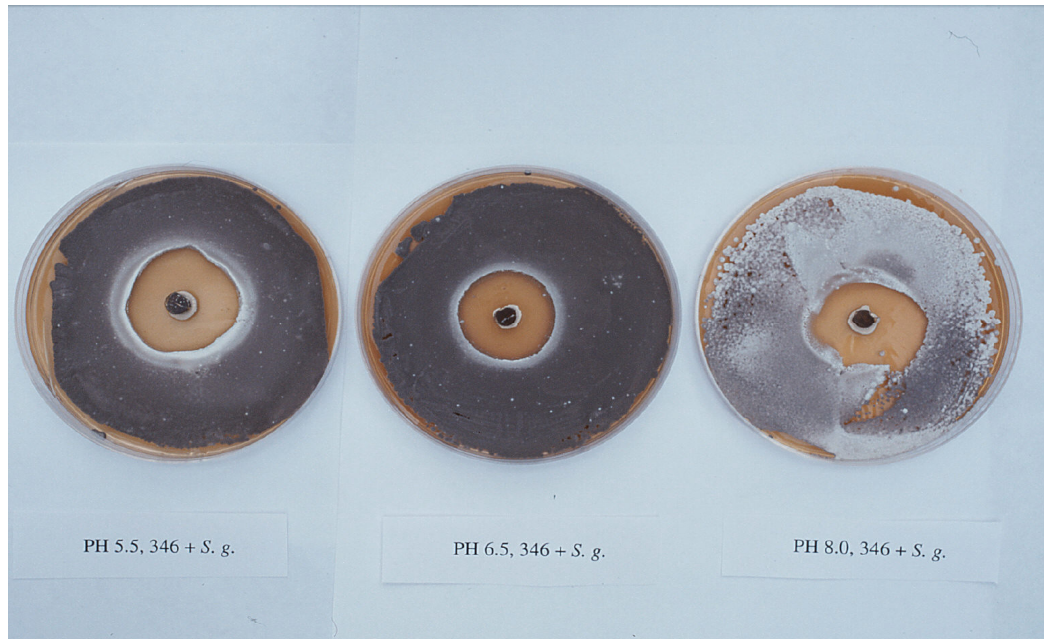
Streptomyces –kantojen käyttäytyminen estokokeissa saadaan tuo tietoa kantojen geneettisestä yhteneväisyydestä. Kaksoiskasvatus kertoo kantojen kyvystä kasvaa toisen kannan vaikutuksen alaisena. Tämä antaa lisää tietoa kannan kilpailukyvystä, antibioottien tuotosta, herkkyydestä toisen kannan tuottamille antibiooteille sekä kantojen kasvunopeuseroista (LIU ym.1996).

Yleensä kannat, jotka ovat aktiivisia antagonisteja maljakokeissa, ovat sitä myös maassa. Kannat, jotka eivät olleet antagonistisia maljakokeissa, voivat silti maaperässä toimia antagonistisesti (BROADBENT ym. 1971). Maljakokeet antavat silti viitteitä sädebakteerien toiminnasta maassa.

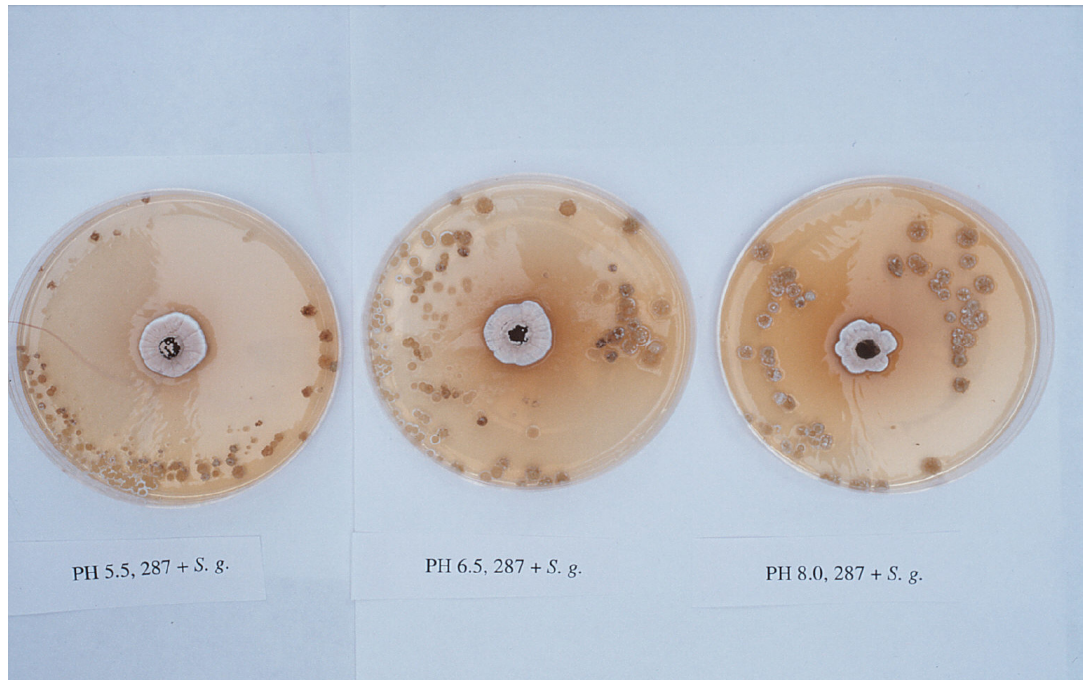
6.3.1 Estovaikutus eri pH-oloissa

On olemassa kahden tyyppisiä estovaikutuksia. Yksi niistä (tyyppi a) ilmenee ohuena estovyöhykkeenä testikantaparien välillä. Tämän tyyppin estovaikutus on tyypillistä BIBB ja HOPWOODin (1981) kuvaamalle kuolettavalle tsygoosireaktiolle (Lethal Zygoosis). Reaktio muodostuu usein eri maantieteellisiltä alueilta peräisin olevien *Streptomyces* –kantojen välille. Toisen tyyppin (b) reaktio on selvä estovyöhyke, mikä aiheutuu kasvatusalustaan imeytyvistä metaboliatuotteista (LORANG ym. 1995).

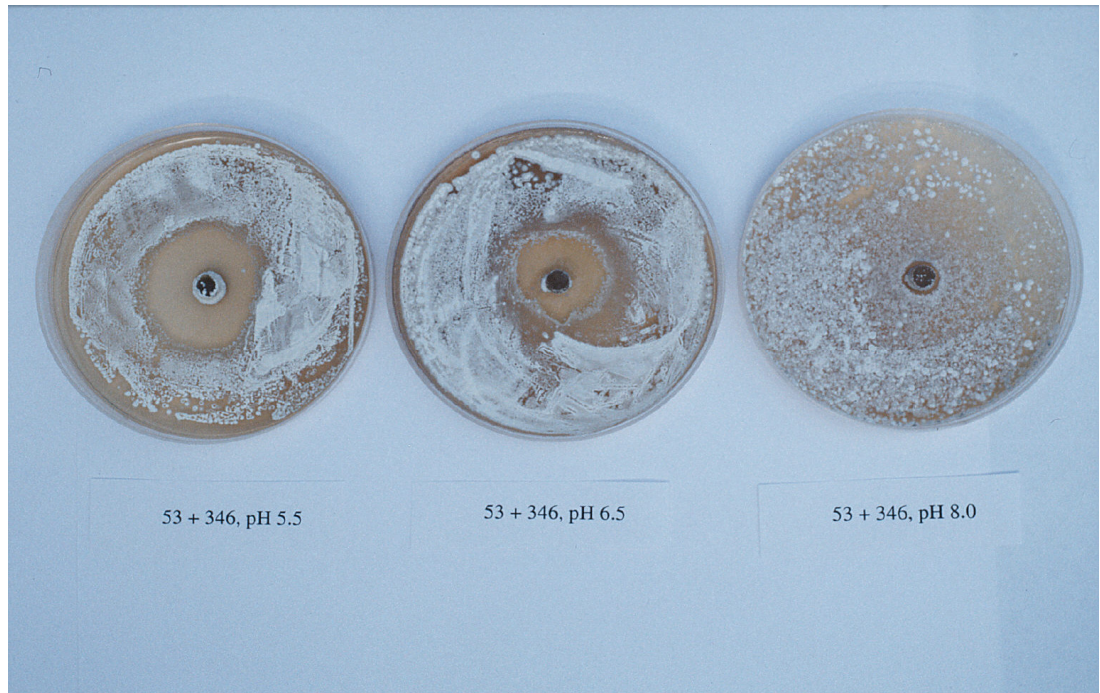
Yksikään tässä työssä testattu kanta ei muodostanut kokeissa estovyöhykettä itsensä kanssa eivätkä samaan lajiin luetut kannat estäneet toistensa kasvua. Esimerkiksi kannat 253, 268 ja 287, jotka kuuluvat lajiin *S. turgidiscabies*, eivät pääsääntöisesti estäneet toistensa kasvua missään pH:ssa. Kannat 267, 53 kuuluvat Lindholm ym. (1997) mukaan ryhmään 1a ja kanta 346 ryhmään 1b. Ryhmän 1a kannat eivät estäneet toistensa kasvua, mutta ryhmän 1a ja 1b kannat eroavat geneettisiltä ominaisuuksiltaan riittävästi estääkseen toistensa kasvua (Taulukko 2, 7, 8 ja 9).



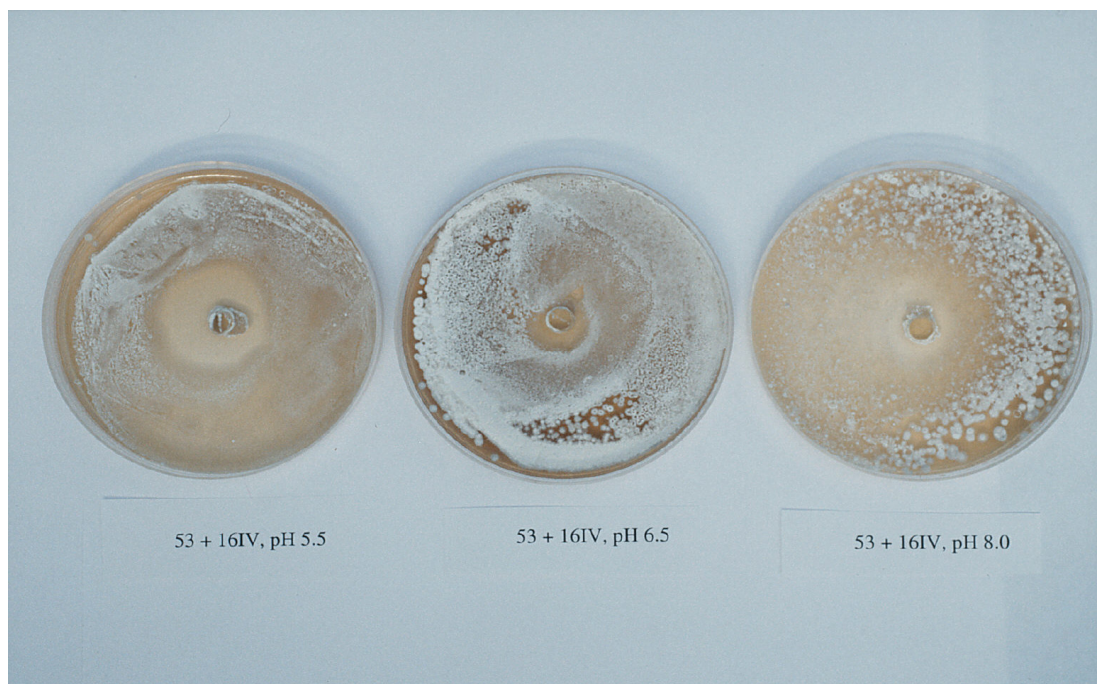
Kuva 12. *Streptomyces griseoviridis* –kanta muodosti kauniit tasaiset estovyöhykkeet kannan 346 kanssa kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa. Kanta 346 on asetettu maljalle pintalevityksenä, jonka jälkeen *S. griseoviridis* on asetettu maljan keskelle kasvualustasta leikatussa kiekossa.



Kuva 13. *Streptomyces griseoviridis* –kannan estovaikutus patogeenisen kannan 287 kasvuun oli erityisen tehokas. Kanta 287 on asetettu maljalle pintalevityksenä ja *S. griseoviridis* kasvualusta kiekossa.



Kuva 14. Kanta 346 muodosti vain ohuen estovyöhykkeen pH:ssa 8.0 kantaa 53 vastaan. Kanta 53 on levitetty maljalle pintalevityksenä ja kanta 634 kasvualusta kiekossaan.



Kuva 15. Kanta 16IV esti kannan 53 kasvun parhaiten pH:ssa 5.5. Kanta 16IV on levitetty kuvassa oleville kasvatusalustoille pintalevityksenä, jonka jälkeen kanta 53 on asetettu alustalle omassa kasvualustakiekossaan.

Eri lajien kannat estivät toiseen lajiin luettujen kantojen kasvua. Esimerkiksi tavallisen perunarupibakteerin kannat estivät pohjanrupibakteerikantojen kasvua ja pohjanrupibakteerit estivät tavallista perunarupibakteeria. Kaikki kannat muodostivat laajan estovyöhykkeen ainakin yhden kannan kanssa eli tyypin b reaktion. Tämä voi johtua kumman kannan tahansa estoaineiden tuotosta. Kannat *S. griseoviridis*, 346, 316, 253, 268 ja 16IV aiheuttivat useamman kannan kanssa laajan estovyöhykkeen, joka voidaan lukea tyyppiin b. Siksi ainakin näiden kantojen voi arvella muodostavan aineenvaihduntatuotteita, joilla on antagonistisia ominaisuuksia (Kuvat 12,13, 14, ja 15). CRAWFORD ym. (1993) havaitsi kokeissaan sädebakteerien aiheuttavan kasvatusalustalla *P. ultimum* -sientä vastaan laajan estovyöhykkeen.

Tyypin a reaktiota saattoi esiintyä kantojen välillä, mutta näiden kokeiden perusteella suuren vaihtelun johdosta asiasta ei voi olla varma. Esimerkiksi kannat 253, 287 ja 316 muodostavat ryhmän, jonka jäsenet vaikuttavat olevan sietokykyisiä toistensa muodostamille aineenvaihduntatuotteille. Kantojen välille ei muodostunut lainkaan estovyöhykettä tai se oli hyvin ohut. Näiden kantojen metaboliatuotteet ovat varmaankin hyvin samanlaisia keskenään. Kanta 253 on löydetty Apukasta, 287 on Mikkelistä ja 316 on peräisin Loimaalta. Ilmiö voi olla myös kuolettava tsygoosireaktio, koska kannat olivat peräisin eri maantieteellisiltä alueilta ja estovyöhyke hyvin pieni.

S. griseoviridis oli tehokkain estämään muiden kantojen kasvua (kuvat 12 ja 13). Myös kanta 346 oli lupaava estovaikutukseltaan (Kuva 14). Se ei kuitenkaan aiheuttanut yhtä suuria estovyöhykkeitä kuin *S. griseoviridis*, mutta estovaikutus oli tasaista. Muut sädebakteerit pystyivät estämään kannan 346 kasvua vain vähän, jopa vähemmän kuin *S. griseoviridis* -bakteeria.

Myös kannan 16IV estovaikutus on huomion arvoinen (Kuva 15). Kokeessa ”pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun” kanta 16IV ei kasvanut pH:ssa 5.5 lainkaan, mutta ”Estovaikutus eri pH-oloissa” -kokeessa kanta kasvoi pH:ssa 5.5, joskin heikosti. Epäilen, että kannan kasvu oli heikentynyt pitkällisen maljakasvatuksen seurauksena, sillä koe ”pH:n vaikutus sädebakteerien kasvuun” suoritettiin viimeisenä. On myös mahdollista, että maljojen pH-säädöissä on sattunut jokin inhimillinen erehdys. Kanta esti kaikkien kantojen kasvun pH:ssa 5.5 ja 8.0 ja pH:ssa 6.5 muiden kantojen paitsi kannan 268 kasvun (Taulukko 6). Kannan kasvu alhaisessa pH:ssa olisi kuitenkin testattava uudestaan, ennen kuin kantaa voi suositella hyväksi biotorjuntaeliöksi Suomen oloihin.

Sädebakteerien toistensa estävä vaikutus ei liittynyt ruvenaiheuttamiskykyyn, sillä sekä ruvenaiheuttajat että rupea aiheuttamattomat kannat estivät muiden kantojen kasvua. Ravintoalustan pH vaikutti suuresti toisten kantojen esto- ja kasvukykyyn. Yleisesti estovaikutus oli suurin, kun estettävä bakteeri kasvoi happamissa oloissa (pH 5.5) (Taulukot 7, 8, ja 9). Tämä voi johtua sitä että *Streptomyces*-bakteerin tuottama antibiootti säilyy pidempään aktiivisena alhaisessa pH:ssa (4.4) kuin korkeammilla pH-arvoilla (ECKWALL & SCHOTTEL 1997).

6.3.2 Kasvualustaan imeytyvät estoaineet

Tässä kokeessa saatiin selville sellaiset kannat, jotka ovat tehokkaita antibioottien tuottajia, mutta joilla on heikompi kasvunopeus. Nämä kannat menestyivät heikomminkin kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa”. Kun vertaillaan kantoja 161V ja 346, nähdään, että kannalla 161V oli tehokkaampi estovaikutus kokeessa ”Kasvualustaan imeytyvät estoaineet”, kun taas kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa” tilanne oli päinvastainen. Kannan 161V heikompaan tulokseen kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa” saattaa olla syynä kannan hidas kasvunopeus. Myös kannan 287 kasvu oli hitaampaa kuin esimerkiksi *S. griseoviridis* -kannalla ja ”Kasvualustaan imeytyvät estoaineet” kokeessa se osoittautui tehokkaaksi estäjäksi, mutta bakteerisaastunnat häiritsivät koetta juuri kannan 287 osalta. Koe olisi suoritettava uudestaan tulosten varmistamiseksi.

ECKWALL & SCHOTTEL (1997) havaitsivat kokeissaan pH:n vaikuttavan *S. diastatochromogenes* -bakteerin tuottaman antibiootin säilyvyyteen. pH:ssa 4.4 antibiootti säilyi varsin hyvin, sillä sen aktiivisuus säilyi huoneenlämmössä useita viikkoja lähes 100 %:sti. pH:ssa 7.0 antibiootti säilyi aktiivisena noin viikon ja pH:ssa 9.6 antibiootin aktiivisuus hävisi jo kahdessa tunnissa. Kokeissamme käytettyjen kasvatusalustojen pH oli 6.5, joten osa antibioottien aktiivisuudesta on saattanut hävitä jo kasvatusaikana. Sädebakteerien kasvua ja aineenvaihduntatuotteiden tuotantoa on kuitenkin tapahtunut kasvatusajan loppuun asti, joten kaikki antibiootti ei ole voinut hävitä ennen kelmun poistoa ja uuden kannan levittämistä. Erittyvä antibiootti leviää sellofaanin läpi tasaisesti koko alla olevalle kasvualustalle. Sellofaanikalvon poiston jälkeen myös antibiootin lähde poistui. Kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa” taas estoaineen erityyminen jatkui koko kasvatusajan estäjäbakteerin kasva-

essa kiekossa. Jos estoaine on bakteriostaattinen, se voi olla huonosti pysyvä ja hajota nopeasti, tai estettävä bakteeri saa sen hajotettua. Niinpä sen vaikutus näkyy kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa”, jossa sitä tuotetaan koko ajan lisää, mutta kokeessa ”Kasvualustaan imeytyvät estoaineet” vaikutus häviää pian sellofaanin poiston jälkeen tai kun levitettävä bakteeri on saanut vaikuttaa jonkin aikaa ja hajottaa estoainetta. Estovaikutus voi näkyä ainoastaan siten, että kasvuun lähtö viivästyy tai kasvu hidastuu, mutta ei absoluuttisesti esty.

Kanta 346 ei estänyt patogeenisten kantojen 53, 267 ja 316 kasvua, mutta kontrolliin verrattaessa niiden kasvu oli heikompaa. On ilmeistä, että kannan 346 tuottaman estoaineen teho oli heikentynyt, koska kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa” kanta muodosti laajat estovyöhykkeet patogeenisten kantojen kanssa. Kannan 346 estoaine saattaa olla bakteriostaattinen, herkkä pH:lle tai patogeenit pystyivät hajottamaan sitä. Kokeen tuloksissa esiintyi vaihtelua kannan 346 osalta, joten ne tulisi suorittaa uudelleen, jotta tuloksista voisi päätellä varmasti. On myös mahdollista, että kannan teho on heikentynyt pitkäaikaisen maljakasvatuksen seurauksena, koska kaikki muut kannat estivät kannan 346 kasvun.

Kannat 16IV ja *S. griseoviridis* tuottavat todennäköisesti pysyviä estoaineita, koska molemmat estivät lähes kaikkien kantojen, paitsi itsensä, kasvun. Myös kannan 287 tulokset olivat lupaavia.

Taudinaiheuttajien läsnäolon ja kasvualustan koostumuksen on havaittu lisäävän antagonististen sienten entsyymien tuotantoa (CHÉRIF & BENHAMOU 1990, DICKINSON ym. 1995). Ehkä myös antagonististen sädebakteerien entsyymituotanto on osittain riippuvainen taudinaiheuttajien läsnäolosta sekä oikeanlaisesta ravinnosta. BECKER (1997) ym. kokeissaan *Streptomyces*-sädebakteereilla havaitsivat antibioottien tuotannon lähtevän nopeammin käyntiin patogeenin läsnä ollessa kuin antagonistin kasvaessa ravintoalustalla yksinään. Tässä työssä estävä kanta kasvoi maljoilla yksin sellofaanin pinnalla eikä käytetty ravintoalusta mahdollisesti sisältänyt riittävästi estoaineiden erityistä edistäviä aineita. Myös tämä voi olla syynä kanna 346 heikompaan tulokseen tässä kokeessa.

Geenit, joita tarvitaan antibioottiresistenssiin, ovat linkittyneet niihin, joita tarvitaan antibioottien tuottoon (CHARTER & BURTON 1985, LIU ym. 1996). Siten niiden kantojen, jotka estivät muiden kantojen kasvun, tulisi sietää myös toisten kantojen muodostamia estoaineita. Kannat *S. griseoviridis* ja 161V estivät muiden kantojen kasvua hyvin ja olivat resistenttejä muiden kantojen estoaineita vastaa. Nii-

den kasvu ei estynyt muiden kantojen vaikutuksesta kokeessa ”Kasvualustaan imeytyvät estoaineet”. Kanta 346 oli tehokas estovaikutukseltaan kokeessa ”Estovaikutus eri pH-oloissa” eikä sen kasvu myöskään estynyt muiden kantojen vaikutuksesta. Kokeessa ”Kasvualustaan imeytyvät estoaineet” kanta 346 ei ollut estovaikutukseltaan tehokas ja muut kannat myös estivät sen kasvun.

6.3.3 Seoskasvatus

Kannan 161V tulokset kokeesta olivat lupaavia, sillä se esti kantojen 267 ja 53 kasvun täysin. Koe vaatii vielä lisää testauskertoja, jotta sen tuloksista voitaisiin olla varmoja. Tulokset ovat suuntaa antavia. Maljoilla kasvoi usein liikaa pesäkkeitä, ja näin ollen melaniinia tuottavien ja melaniinia tuottamattomien kantojen pesäkkeet oli hankala erottaa toisistaan. Saastukesuspensioden olisi pitänyt olla laimeampia.

S. griseoviridis ei estänyt muiden kantojen kasvua tässä kokeessa, vaikka kaikissa muissa kokeissa se osoittautui tehokkaaksi estovaikutukseltaan. Kannan estomekanismi saattaa olla sellainen, että se ei toiminut tässä kokeessa. KORTEMAA ym. (1997b) mukaan *S. griseoviridis* -bitorjuntaeliö kilpailee heikosti muiden mikrobien kanssa, jos sitä ei ole kasvualustassa kylvöhetkellä. Myös *S. hygroscopius* var. *geldanus* antagonisti täytyy asettaa kasvualustaan vähintään kaksi vuorokautta ennen *R. solani* -patogeenin asettamista, jotta antagonisti torjuu herneen taimipoltetta hyvin. Tämä aika antagonistilla kuluu geldamysiini -antibiootin muodostamiseen (ROTHROCK & GOTTLIEB 1984). Luultavasti muut kannat ehtivät kasvattaa pesäkkeitä, ennen kuin *S. griseoviridis* saa antibioottituotantonsa käyntiin.

Seoskasvatuskokeessa kanta 346 ja *Streptomyces griseoviridis* eivät estäneet muiden kantojen kasvua, mutta niidenkään kasvua eivät pystyneet muut kannat estämään.

6.4 Juurenasutuskyky

Tarkoituksena oli luoda mahdollisimman luonnolliset tutkimusolot ja siksi käytettiin steriloimatonta hiekkaa. Myös HATZINGER & ALEXANDER (1994) käyttivät bakteerien asuttamisen testaamiseen steriloimatonta kasvualustaa. AGBESSI ym.

(2003) käyttivät steriloitua hiekkaa. Steriloimattoman hiekan käyttö saattoi aiheuttaa vääristymää tuloksiin. Sädebakteerien juurenasutuskyky on näin ollen voitu laskea liian korkeaksi, jos hiekassa on jo alun perin ollut sädebakteereita, tai hiekassa olleet muut bakteerit ovat häirinneet sädebakteerien kasvuun.

Lisäksi kokeessa sattui käytännön virhe. Perunoita piti kasvattaa uusissa kennoissa. Kokeessa kuitenkin käytettiin vanhoja pestyjä ja etanolilla steriloituja kennoja, joissa oli aikaisemmin kasvatettu perunoita turpeessa. Kennoihin on saattanut jäädä turpeen luonnollisia sädebakteereita, mikä saattaa vääristää tuloksia. Lisäksi pesäkelukumäärän perusteella ei sädebakteerien määrää maassa pystytä täysin luotettavasti määrittämään, sillä pesäke voi muodostua joko itiöstä, tai suuresta määrästä rihmastoja (SHIRING & GOTTLIEB 1966).

7 YHTEENVETO

Suomalaiset sädebakteerikannat osoittautuivat varsin tehokkaiksi antagonisteiksi *R. solani* ja *H. solani* –sieniä vastaan. Kannat 161V ja 346 estivät sekä perunaseitin että harmaahilseen kasvua yhtä tehokkaasti kuin *S. griseoviridis*.

Kaikki testatut sädebakteerikannat kasvoivat hyvin pH-tasoilla 6.5 ja 8.0. pH:ssa 5.5 kantojen kasvukyky vaihteli. Kanta 16IV menestyi heikommin pH:ssa 5.5 ja kanta 346 viihtyy parhaiten pH-tasoilla 5.5 ja 6.5. *Streptomyces griseoviridis* viihtyi yhtäläisesti kaikilla testatuilla pH-tasoilla.

Kokeiden ”Rupilaikuista eristettyjen sädebakteerien keskinäiset estovai-
kutukset” perusteella voi päätellä, että kannat *S. griseoviridis* ja 346 kilpailevat heikommin muiden mikrobien kanssa kuin kanta 16IV, jos kannat asetetaan kasvualustalle samanaikaisesti. Kannan 346 muodostamat estoaineet säilyvät kannoista heikoinnissa ja kantojen 16IV ja 287 kilpailukyky kasvunopeudessa on heikompi kuin kannoilla 346 ja *S. griseoviridis*.

Sädebakteerien toistensa estävä vaikutus ei liittynyt ruvenaiheuttamisky-
kyyn, sillä sekä ruvenaiheuttajat että rupea aiheuttamattomat kannat estivät muiden kasvua. Eri kannoilla oli hyviä biologisen torjuntaeliön ominaisuuksia erilaisiin olo-
suhteisiin. Varsinkin kannat 16IV ja 346 esittivät lupaavia tuloksia tulevaisuuden biologiseksi torjuntaeliöksi.

KIRJALLISUUS

ADAMS, M. J. ja LAPWOOD, D. H. 1978. Studies on the lenticel development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils. Ann. appl. Biol. 90: 335-343.

AGBESSI, S., BEAUSÉJOUR, J., DÉRY, C. ja BEAULIEU, C. 2003. Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 233-238.

ALEXANDER, M. 1997. Introduction to Soil Microbiology, 2nd Ed. 467 s. John Wiley and Sons, New York.

ALIVIZATOS, A. S. ja PANTAZIS, S. 1992. Preliminary studies on biological control of potato common scab caused by *Streptomyces* sp. Biological control of plant diseases progress and challenges for the future. Ed. Tjamos E. C., Papauzas G. C. ja Cook R. J. NATO ASI Series, New York. 462 s.

ARCHULETA, J. G. ja EASTON, G. D. 1981. The cause of deep-pitted scab of potato. Am. Potato J. 58: 385-392

AREMU, E. A., FURUMAI, T., IGARASHI, Y., SATO, Y., AKAMATSU, H., KODAMATA, M. ja OTANI, H. 2003. Specific inhibition of spore germination of *Alternaria brassicola* by fistubyrone from *Streptomyces* sp. TP-AO569. J. Gen. Plant Pathol. 69: 211-217.

BAHME, J. B. & SCHROTH, M. N. 1987. Spatial – temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. Phytopathology 77: 1093-1100.

BAKKEN, L. R. ja OLSEN, R. A. 1987. The relationship between cell size and viability of soil bacteria. Microb. Ecol. 13: 103-114. (Ref. MILLER ym. 1990).

BECKER, D. M., KINKEL, L. L. ja SCHOTTEL, J. L. 1997. Evidence for interspecies communication and its potential role in pathogen suppression in a naturally occurring disease suppressive soil. *Can. J. Microbiol.* 43: 985-990.

BENNETT, R. A, ja LYNCH, J. M. 1981a. Colonization potential of bacteria in the rhizosphere. *Curr. Microbiol.* 6: 137-138. (Ref. HATZINGER & ALEXANDER 1994).

BENNETT, R. A, ja LYNCH, J. M. 1981b. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. *J. Gen. Microbiol.* 125: 95-102. (Ref. HATZINGER & ALEXANDER 1994).

BERG, L. 2007. Tutkimus on askeleen edellä. *Leipä leveämmäksi.* 4: 36-37.

BEYER, M. ja DIEKMANN, H. 1985. The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:140-146.

BIBB, M. J. ja HOPWOOD, D. A. 1981. Genetic studies of the fertility plasmid SCP2 and its SCP2* variants in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Gen. Microbiol.* 126: 427-442.

BROADBENT, P., BAKER, K. F. ja WATERWORTH, Y. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 925-944. (Ref. CRAWFORD ym. 1993).

BÅNG, H. 1979a. Studies on potato russet scab. 2. Influence of infection on the production capacity of seed. *Potato Res.* 22: 203-208.

BÅNG, H. 1979b. Studies on potato russet scab. 1. A characterization of different isolates from northern Sweden. *Acta Agric. Scand.* 29: 145-150.

BÅNG, H. 1995. Effects of soil conditions on the prevalence of netted scab. *Acta agric. Scand. Sect. B. Soil and Plant Sci.* 45: 271-177.

CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge, Cambridge University Press. 212 s.

CHARTER, K. F. ja BURTON, C. J. 1985. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. EMBO J. 4 . 1893-1897. (Ref. LIU ym. 1996).

CHÉRIF, M. ja BENHAMOU, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80: 1406-1414.

CRAWFORD, D. L., LYNCH, J. M., WHIPPS, J. M. ja OUSLEY, M. A. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3889-3905.

CURL, E. A. ja TRUELOVE, B. 1986. The rhizosphere. Berlin, Springer Verlag. 281 s. (Ref. KORTEMAA 1998).

DAVIS, J. R., MCMASTER, G. M., CALLIHAN, R. H., NISSLEY, F. H. ja PAVEK, J. J. 1976. Influence of soil moisture and fungicide treatments on common scab and mineral content of potatoes. Phytopathology 66: 228-233.

DICKINSON, J. M., HANSON, J. R. ja TRUNEH, A. 1995. Metabolites of some biological control agents. Pestic. Sci. 44: 389-393

DOERING-SAAD, C., KÄMPFER, P., MANULIS, S., KRITZMAN, G., SCHNEIDER, J., ZAKRZWSKA-CZERWINSKA, J., SCHREMPF, H. ja BARASH, I. 1992. Diversity among *Streptomyces* strains causing potato scab. Appl. Environ. Micro. 58: 3932-3940.

ECKWALD, E. C. ja SCHOTTEL, J. L. 1997. Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogens* strains PonSSII. J. Ind. Microb. & Biotechn. 19: 220-225.

- EL-ABAYAD, M. S., EL-SAYED, M. A., EL-SHANSHOURY, A. R. ja EL-SABBAGH, S. M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. Plant and Soil. 149: 185-195.
- FAUCHER, E., OTRYSKO, B., PARAIDS, E., HODGE, N. C., STALL, R. E. ja BEAULIEU, C. 1993. Characterization of *Streptomyces* causing Russet scab in Quebec. Plant Dis. 77(12): 1217-1220.
- FAUCHER, E., PARADIS, E., GOYER, C., HODGE, N. C., HOGUE, R., STALL, R. E. ja BEAULIEU, C. 1995. Characterization of srteptomycetes causing deep-pitted scab of potato in Quebec, Canada. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 222-225.
- FRY, B. A. ja LORIA, R. 2002. Thaxtomin A: evidence for a plant cell wall target. Physiol. Mol. Plant Pathol. 60: 1-8.
- GINTHER, C. L. 1979. Sporulation and the production of serine protease and Cephamicin C by *Streptomyces lactamdurans*. Antimicrob. Agents Chemother. 15: 522-526. (Ref. LAHDENPERÄ 1987).
- GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. ja MORDARSKI, M. 1988. Actinomycetes in biotechnology. Academic Press. London.
- GOTH, R. W., HAYNES, K. G. ja WILSON, D. R. 1993. Evaluation and characterization of advanced potato breeding clones for resistance to scab by cluster analysis. Plant Dis. 77: 911-914.
- GOYER, C. ja BEAULIEU, C. 1997. Host range of *Streptomyces* strains causing common scab. Plant Dis. 81(8): 901-904.
- GOYER, C., FAUCHER, E. ja BEAULIEU, C. 1996. *S. caviscabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Quebec, Canada. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 635-639.

HARRISON, M. D. 1962. Potato russet scab, its cause and factors affecting its developments. Am. Potato J. 39: 368-387.

HATZINGER, P. B. ja ALEXANDER, M. 1994. Relationship between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. Plant and Soil 158: 211-222.

HAYASHIDA, S., CHOI, M.-Y., NANRI, N. ja MIYAGUCHI, M. 1988. Production of potato common scab-antagonistic biofertilizer from svine feces with *Streptomyces albidoflavus*. Agric. Biol. Chem. 52: 2397-2402.

HAYASHIDA, S., CHOI, M.-Y., NANRI, N., YOKOYAMA, M. ja UEMATSU, T. 1989. Control of potato common scab with an antibiotic fertilicer produced from svine feces containin *Streptomyces*. Agirc. Biol. Chem. 53: 349-354.

HEALY, F. G. ja LAMBERT, D. H. 1991. Relationships among *Streptomyces* spp. causing potato scab. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 479-482.

HILTUNEN, L. H., LINFIELD, C. A. ja WHITE, J. G. 1995. The potential for the biological control of basal rot of *Narcissus* by *Streptomyces* sp. Crop Prot. 14(7): 539-542.

HILTUNEN, L. H., WECKMAN, A., YLHÄINEN, A., RITA, H., RICHTER, E. ja VALKONEN, J. P. T. 2005. Responses of potato cultivars to the comon scab pathogens, *Streptomyces scabies* and *S. turgidiscabies*. Ann. appl. Biol. 146: 395-403.

HOOKER, W. J. 1956. Survival of *Streptomyces scabies* in peat soil planted with various crops. Phytopathology 46: 677-681. (Ref. KEINATH & LORIA 1989a).

HOOKER, W. J. 1981. Common scab. Teoksessa Hooker, W., J. (ed). Compendium of potato diseases. St. Paul, MN. s. 33-34.

HOPWOOD, D. 1990. Antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*, s. 129-148 teoksessa: D. A. Hopwood ja K. Charter (ed), Genetics of bacterial diversity. Academic Press, London.

HOSAKA, K., MATSUNAGA, H. ja SENDA, K. 2000. Evaluations of several wild tuber-bearing *Solanum* species for scab resistance. Amer. J. Potato Res. 77: 41-45.

JELLIS, G., J. 1977. The relative importance of host and environment in determining the incidence and severity of lesions of common scab (*Streptomyces scabies*) on potato. Potato Res. 20: 295-301.

JONES, A. P. 1953. Parsnip canker. Nature (Lond.) 171: 574. (Ref. GOYER & BEAULIEU 1997).

KEINATH, A. P. ja LORIA, R. 1989a. Population dynamics of *Streptomyces scabies* and other actinomycetes as related to common scab of potato. Ecology and Epidemiology, Am. Phytopathol. Society 76(6): 681-686.

KEINATH, A. P. ja LORIA, R. 1989b. Melanin-producing *Streptomyces* spp. Respond to potato plant growth and differentially to potato cultivars. Can. J. Microbiol. 36: 279-285.

KEINATH, A. P. ja LORIA, R. 1991. Effects of inoculum density and cultivar resistance on common scab of potato and population dynamics of *Streptomyces scabies*. Am. Potato J. 68: 515-524.

KING, R. R., LAWRENCE, C. H., CLARK, M. C. 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolated from scab infected potato tubers. Am. Potato J. 68: 675-680.

KING, R. R. ja LAWRENCE, C. H. 1996. Isolation and identification of pigments generated *in Vitro* by *Streptomyces acidiscabies*. J. Agric. Food Chem. 44: 2849-2851.

KORHONEN, M. 1995. SAS jatkokurssi, Tilastollinen analyysi. ATK-keskuksen oppaat- nro 26. Helsingin Yliopisto. 105 s.

KORTEMAA, H., PENNANEN, T., SMOLANDER, A. ja HAAHTELA, K. 1997a. Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhizosphere and nonrhizosphere sand. J. Phytopathol. 145: 137-143.

KORTEMAA, H., HAAHTELA, K. ja SMOLANDER, A. 1997b. Effect of soil-sprayin time on root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. Agr. Food Sci. Finl. 6: 341-348.

KREUZE, J. F., SUOMALAINEN, S., PAULIN, L. ja VALKONEN, J. P. T. 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of nec1 gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab and netted scab in Finland. Phytopathology 89: 462-469.

KUISMA, P. 1997. Mangaani ja ruventorjunta. Tuottava peruna 2: 18-19.

LABRUYÈRE, R. E. 1971. Common scab and its control in seed-potato crops. Meded. Inst. Plziekten. Onderz. 575. 71 pp. (Ref. KEINATH & LORIA 1989a).

LACEY, J. 1973. Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: Sykes, G. & Skinner, f. a. (eds.) Actinomycetales: characteristics and practical importance. London, Academic Press. s. 231-251.

LAHDENPERÄ, M-L. 1987. *Streptomyces* sädesienivalmiste ja sen käyttö *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* –sienen aiheuttaman neilikanlakastumistaudin torjunnassa. Lisesiaattityö. Helsingin yliopisto kasvipatologian laitos. 102 s.

LAHDENPERÄ, M-L. 1995. Mycostop kivivillassa. Kasvinsuojelulehti 4: 108-110.

LAMBERT, D. H. ja LORIA, R. 1989a. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 387-392.

LAMBERT, D. H. ja LORIA, R. 1989b. *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 393-396.

LAMBERT, D. H. ja MANZER, F. E. 1991. Relationship of calcium to potato scab. Phytopathology 81: 632-636.

LAPWOOD, D. H. 1973. *Streptomyces scabies* and potato scab disease. s. 253-260.

LAWRENCE, C. H., CLARK, C. M. ja KING, R. R. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. Phytopathology 80: 606-608.

LEHTONEN, M., HILTUNEN, L., ISOLAHTI, M., KOSKI, P., LAAKSO, I., LAURONEN, M., PALOHUHTA, J. P., RANTALA, H., REINIKAINEN, O., VIHLMAN, K., VIRTANEN, E., WECMAN, A., YLHÄINEN A. ja VALKONEN, J. 2003. Perunaruven aiheuttajat ja niiden torjunta. Kavipatologian loppuraportteja, osa 2. Helsingin yliopisto, Soveltavan biologian laitos, 40 s. +28 liitesivua.

LEHTONEN, M. J., RANTALA, H., KREUZE, J. F., BÂNG, H., KUISMA, L., KOSKI, P., VIRTANEN, E., VIHLMAN, K. ja VALKONEN, J. P. T. 2004. Occurrence and survival of potato scab pathogens (*Streptomyces scabies*) on tuber lesions: quick diagnosis based on a PCR-based assay. Plant Pathol. 53: 280-287.

LEINER, R. H., FRY, B. A., CARLING, D. E. ja LORIA, R. 1996. Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* seedlings. Phytopathology 86: 709-713.

LEWIS, B. G. 1970. Effects of water potential on the infection of potato tubers by *Streptomyces scabies* in soil. Ann. appl. Biol. 66: 83-88.

LINDHOLM, P., KORTEMAA, H., KOKKOLA, M., HAAHTELA, K., SALKINOJA-SALONEN, M., ja VALKONEN, J. P. T. 1997. *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. Plant Dis. 81: 1317-1322.

LIU, D. 1992. Biological control of *Streptomyces scabies* and other plant pathogens. Ph. D. thesis, University of Minnesota, Saint Paul, Minn. (Ref. LIU ym. 1996).

LIU, D., ANDESSON, N. A. ja KINKEL, L. L. 1995. Biological control of potato scab in the field with antagonistic *Streptomyces scabies*. The American Phytopathol. Soc. 86(7): 827-813.

LIU, D., ANDERSSON, N. A. ja KINKEL, L. 1996. Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. Can. J. Microbiol. 42: 487-502.

LLOYD, A. B. 1969. Behaviour of *Streptomyces* in soil. J. Gen. Microbiol. 56: 165-170. (Ref. LAHDENPERÄ 1987).

LOMAKKA, L. 1971. Resultat av potatis i monokulturförsök i Norrland. Lantbruks-högskolan. Konsulentavdelningens stencilserie. Mark-Växter 6: 25-32. (Ref. BÅNG 1995).

LORANG, J. M. 1988. Heterokaryosis and inhibitory reactions among isolates of *Streptomyces scabies* causing scab on potato. M. S. thesis. University of Minnesota, St Paul, MN. (Ref. LORANG ym. 1995).

LORANG, J. M., ANDERSON, N. A., LAUER, F. I. ja WILDUNG, D. K. 1989. Disease decline in a Minnesota potato scab plot. Am. Potato J. 66: 531.

LORANG, J. M., LIU, D., ANDERSON, N. A. ja SCHOTTEL, J. L. 1995. Identification of potato scab inducing and suppressive species of *Streptomyces*. Phytopathology 85: 261-268.

LORIA, R. 1991. Potato scab. In: Diseases of Potato. New York State Pest Management Program Fact Sheet. Cornell Cooperative Extension, Ithaca, NY, USA. S. 725.80.

LORIA, R., BUKHALID, R. A., CREATH, R. A., LEINER, R. H., OLIVIER, M. ja STEFFENS, J. C. 1995. Differential production of taxtomins by pathogenic *Streptomyces* species *in Vitro*. *Phytopathology* 85: 537-541.

LORIA, R., BUKHALID, R. A., FRY, B. A. ja KING, R. R. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* 81(8): 836-846.

LORIA, R., GRACE, E. A., BUKHALID, R. A. ja FRY, B. A. 1996. *Streptomyces acidiscabies* reduces growth and causes cell hypertrophy and necrosis on monocot and dicot seedlings. *Phytopathology* 86: 78-82.

LORIA, R., ja KEMPTER, B. A. 1986. Relative resistance of potato tubers produced from stem cuttings and seed-piece-propagated plants to *Streptomyces scabies*. *Plant Dis.* 70(12): 1146-1148.

MANZER, F. E., McINTYRE, G. A. ja MERRIAM, D. C. 1977. A new potato scab problem in Maine. *Univ. Maine Tech. Bull.* 85. (Ref. LORIA ym. 1997).

MENZIES, J. D. 1959. Occurence and transfer of a biological factor in soil that suppresses potato scab. *Phytopathology* 49: 648-652. (Ref. LORANG ym. 1995).

MIYAJIMA, K., TANAKA, F., TAKEUCHI, T. ja KUNINAGA, S. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 495-502.

MOHAMMADI, O. ja LAHDENPERÄ M-L. 1994. Impact of application method on efficacy of Mycostop biofungisice. In: Ryder, M. H., Stephens, P. M. ja Bowen, G. D. (eds.). *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Proceedings of the Third International Workshop on Plant-Growth promoting Rhizobacteria.* CSIRO, Australia. s. 279-281.

MUKARAMI, T., ANZAI, H., IMAI, S., SATOH, A., NAGAOKA, K. ja THOMPSON, C. J. 1986. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 205: 42-50.

O'BRIEN, J. G., BLANCHETTE, R. A. ja SUTHERLAND, J. B. 1984. Assessment of *Streptomyces* spp. from elms for biological control of dutch elm disease. Plant Dis. 68(2): 104-106.

OLSEN, R. A. ja BAKKEN L. R. 1987. Variability of soil bacteria: optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts with different size groups. Microb. Ecol. 13: 59-74. (Ref. MILLER ym. 1990).

ONIKI, M., SUZUI, T., ARAKI, T., SONODA, R-I., CHIBA, T. ja TAKEDA, T. 1986. Causal agent of russet scab of potato. Bull. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci. 2: 56-59. (Ref. LORIA ym. 1997).

POWELSON, M. L., JOHNSON, K. B. ja ROWE, R. C. 1993. Management of diseases caused by soilborne pathogens. Sivut 149-158 teoksesta: Potato Health Management. R. C. Rowe, ed. American Phytopathological society, St. Paul, MN.

ORAVUO, M. 1994. "Ruukkumenetelmän" soveltuvuus perunaruven (*Streptomyces scabies*) alttiuden testaukseen jalostusmateriaalin valinnassa. Pro gradu-tutkielma. Helsingin yliopisto, Kasvintuotantotieteen laitos. 75 s.

RAATIKAINEN, O., TUOMISTO, J., TAHVONEN, R. ja ROSENQVIST, H. 1993. Polyene production of antagonistic *Streptomyces* species isolated from Spagnum peat. Agric. Sci. Finl. 2: 551-560.

RAHKONEN, A. 1997. Lajikevalinta käyttötarkoituksen mukaan. Perunalajikkeet 1997 s. 13-17. Tieto tuottamaan 74. Maaseutukeskusten Liiton julkaisuja no 913.

ROTHROCK, C. S. ja GOTTLIEB, D. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. Can. J. Microbiol. 30: 1440-1447.

SANFORD, G. B. 1926. Some factors affecting the patogenicity of *Actinomyces scabies*. Phytopathology. 16: 525-547. (Ref. ORAVUO 1994).

SAS-Institute INC. 1992. SAS/STAT user's guide. Version 6,4 th ed. Vol. 2 SAS Institute inc. Cary, N. C. USA.

SCHEIBLE, W. R., FRY, B., KOCHEVENKO, A., SCHINDELASCH, D., ZIMMERLI, L. ja SOMERVILLE, S. 2003. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. Plant Cell 15: 1781-1794.

SCHOLTE, K. 1989. The effect of netted scab (*Streptomyces* spp.) and *Verticillium dahliae* on growth and yield of potato. Potato Res. 32:65-73. (Ref. BÅNG 1995).

SCHOLTE, K. 1992. Kartoffelschorf. Kartoffelbau 43: 50-55. (Ref. BÅNG 1995).

SCHOLTE, K. ja LABRUYÈRE, R. E. 1985. Netted scab: a new name for an old disease in Europe. Potato Res. 28: 443-448.

SCOTT, T. K. 1972. Auxin and roots. Annu. Rev. Plant Physiol. 23: 235-258.

SHIRLING, E. B. ja GOTTLIEB, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 313-340.

SLACK, S. A. 1991. A look at potato leafroll virus and potato virus Y: Past, present and future. Badger common 'tater 43: 16-21. (Ref. LORIA ym. 1997).

SMITH, J., PUTNAM, A. ja NAIR, M. 1990. *In vitro* control of *Fusarium* diseases of *Asparagus officinalis* L. with a *Streptomyces* or its polyene antibiotic, faeriefungin. J. Agric. Food Chem. 38: 1739-1933.

TAHVONEN, R. 1982a. The supressivenes of Finnish light coloured *Sphagnum* peat. J. Scient. Agric. Soc. Finland 54: 345-356.

TAHVONEN, R. 1982b. Premilinary experiments into the use of *Streptomyces* spp. Isolated from peat in the biological control of soil and seedborne diseases in peat culture. J. Agric. Sci. Finl. 54: 357-369.

TAHVONEN, R. T. 1988. Microbial control of plant diseases with *Streptomyces* spp. EPPO Bulletin. 18: 55-59.

TAHVONEN, R. ja AVIKAINEN H. 1987. The biological control of seedborne *Alternaria brassicola* of cruciferous plants with a powdery preparation of *Streptomyces* sp. J. Agric. Sci. Finl. 59: 199-208.

TAHVONEN, R. ja LAHDENPERÄ M. 1988. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Rizoctonia solani* in lettuce by *Streptomyces* sp. Ann. Agric. Fenn. 27: 107-116.

TANAKA, Y., KANAYA, I., TAJAHASHI, Y., SHINOSE, M., TANAKA, H. ja OSMURA, S. 1993. Phthxazolin A, a specific inhibitor of cellulose biosynthesis from microbial organ. I. Discovery, taxonomy and biological activity. J. Antibiot 46: 1208-1209. (Ref. AREMU ym. 2003)

TANII, A., TAKEUCHI, T. ja HORITA, H. 1990. Biological control of scab, black scurf and soft rot of potato by seed tuber bacterization. S. 143-164 teoksessa Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens. D. Hornby, (ed.) C. A. B. International, Wallingford, England.

TAPIO, E. ja POHTO-LAHDENPERÄ, A. 1991. Scanning electron microscopy of hyphal interaction between *Streptomyces griseoviridis* and some plant pathogenic fungi. Agric. Food Sci. Finl. 63: 435-441.

THAXTER, R. 1891. The potato scab. Conn. Agric. Exp. Stn. Rep. 1890: 81-85. (Ref. LORIA ym. 1997)

TROSMO, A. ja DENNIS, C. 1978. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. Trans. Br. mycol. Soc. 71:469-474.

TUOMI, T., LAAKSO, S. ja ROSENQVIST, H. 1994. Indole-3-acetic acid (IAA) production by a biofungicide *Streptomyces griseoviridis* strain. Ann Bot. Fenn. 31: 59-63.

- VALKONEN, J., BREMER, K. ja TAPIO, E. 1996a. Kasvi sairastaa –oppi kasvi-taudeista. Yliopistopaino Helsinki. 179 s.
- VALKONEN, J. P. T., KORTEMAA, H. ja KOKKOLA, M. 1996b. Suomalaiset pe-runarupikannat. Tuottava peruna 4: 17-18.
- VALKONEN, J. P. T. ja PALOHUHTA, J-P. 1999. Perunarupi yhä arvoitus. Tuotta-va peruna 3: 11-12.
- VALKONEN, J. P. T. 2000. Perunaruven aiheuttajat ja niiden torjunta. Tuottava peruna 4:119-21.
- VRUGGINK, H. 1976. Influence of agricultural crops on the actinomycetes flora in soil. Plant Soil 44: 639-654. (Ref. KEINATH & LORIA, 1991).
- WAKSMAN, S. A. ja HENRICI, A. T. 1948. Family II. *Actinomycetaceae* Buchanan and family *Streptomycetaceae* Wacsmann and Henrici, p. 892-980. In Bergeys manual of determinative bacteriology, 6th ed. R. Breed, E. G. D. Murray, and A. P. Hitchens eds. The Williams & Wilks Co., Baltimore. (Ref. LORIA ym. 1997).
- WELLER, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26: 379-407.
- WELLER, D. M., RAAIJMAKERS, J. M., MCSPADDEN GARDENER, B. B. ja THOMASHOW, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 40: 309-348.
- YLHÄINEN, A. 2001. Pro gradututkielma. Helsingin yliopisto kasvipatologian lai-tos. s.
- YUAN, W. M. ja CRAWFORD, D. L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 61. 8: 3119-3128.